

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

Scuola Politecnica e delle Scienze di Base



Dottorato di ricerca in Biologia Applicata

XXVII Ciclo

Tesi di Dottorato

“Studio dell’attività anti-microbica e delle proprietà
anti-infiammatorie di una molecola secreta da
Lactobacillus gasseri SF1109”

“A study of anti-microbial and anti-inflammatory
activity of *Lactobacillus gasseri* SF1109 secreted
molecule”

Coordinatore:
Ch.mo Prof. Ezio Ricca

Candidato:
Dott. Giuseppina Criscuolo

Tutor:
Prof. Mario Varcamonti

INDICE

CAPITOLO 1 INTRODUZIONE	5
1.1 Il microbiota intestinale	5
1.1.1 Composizione.....	5
1.1.2 Funzioni metaboliche	8
1.2 I batteri lattici e la produzione di molecole anti- microbiche	10
1.2.1 Le batteriocine.....	10
1.2.2 Classificazione delle batteriocine.....	11
1.2.3 Ottimizzazione e fattori che influenzano la produzione di batteriocine.	14
1.3 I Peptidi anti-microbici (AMPs) e altre molecole prodotte dai batteri lattici.	16
1.4 L'omeostasi intestinale.....	19
1.5 Il microbiota polmonare e le sue connessioni con quello intestinale.	29
1.6 L'azione anti-microbica dei probiotici contro ceppi di <i>P.aeruginosa</i>	35
SCOPO e SINTESI.....	38
CAPITOLO 2 MATERIALI E METODI	43
2.1 Ceppi di Lattobacilli	43
2.2 Crescita batterica e preparazione del <i>CFS (cell- free supernatant)</i>	43
2.3 Ceppi batterici indicatori	44
2.4 Saggio dell'alone d'inibizione.	45
2.5 Ottimizzazione delle condizioni di coltura.	46
2.6 Sensibilità del <i>CFS</i> a pH e temperatura.	46
2.7 Determinazione del peso molecolare mediante frazionamento	47
2.8 Saggi di attività anti-microbica.....	48

2.9 Determinazione della Minima Concentrazione Inibente la Crescita (MIC).	49
2.10 Colorazione con DAPI/IP.	49
2.11 Acquisizione immagini mediante microscopia a fluorescenza.....	50
2.12 Colture cellulari e trattamento con CFS batterico.	51
2.13 Analisi di SDS-PAGE e Western blot.	51
2.14 Colorazione del gel di poliacrilammide con Blu di Comassie.....	53
2.15 Crescita cellulare e analisi di citometria di flusso.	53
2.16 Saggio MTS.	54
2.17 Cromatografia di esclusione molecolare, spettrometria di massa (MALDI) e Risonanza Magnetica Nucleare (NMR).....	55
CAPITOLO 3 RISULTATI	56
3.1 Screening di Lattobacilli.....	56
3.2 Ottimizzazione delle condizioni di coltura del ceppo <i>L. gasseri</i> SF1109.	58
3.3 Effetti di variazioni di pH e temperatura sull'attività antimicrobica del CFS di <i>L. gasseri</i> SF1109.	63
3.4 Effetti dell'attività antimicrobica del CFS dopo frazionamento.	67
3.5 Attività antimicrobica e determinazione della MIC.	69
3.6 Studi di interazione delle cellule di <i>P.aeruginosa</i> con il CFS.	71
3.7 Studio dell'attività antimicrobica del CFS su ceppi intestinali: <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. typhimurium</i> e <i>S. sonnei</i>	74
3.8 Studio dell'effetto del CFS su una linea di adenocarcinoma del colon (HCT116) in seguito ad induzione pro-infiammatoria con LPS purificato da <i>E. coli</i>	77
3.9 Effetti del CFS sulla proliferazione cellulare delle HCT116.....	81
3.10 Caratterizzazione della molecola attiva del CFS mediante cromatografia di esclusione molecolare e saggi di attività antimicrobica delle frazioni ottenute.....	86
3.11 Studio dell'effetto della frazione attiva sulla linea cellulare HCT116 in seguito ad induzione pro-infiammatoria con LPS, purificato da <i>E. coli</i>	88
3.12 Effetti della frazione attiva sulla proliferazione cellulare delle HCT116.....	89
3.13 Caratterizzazione strutturale mediante AP-MALDI ed NMR della molecola contenuta nella frazione attiva.	93
DISCUSSIONE	95

BIBLIOGRAFIA	102
--------------------	-----

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 Il microbiota intestinale

1.1.1 Composizione

Il tratto gastro-intestinale (GI) dell'uomo contiene oltre 10^{14} microrganismi, costituenti il microbiota intestinale, distribuiti in maniera differente nei vari distretti dell'apparato digerente. Nello stomaco di un individuo adulto sano vi è un basso numero di batteri (10^2 - 10^4 CFU/ml), che comprende bacilli, enterococchi e lattobacilli. Il duodeno, che ha un pH di 4-5, ha un numero di batteri di 10^4 CFU/ml costituito soprattutto da lattobacilli, streptococchi, stafilococchi e lieviti. Nell'intestino crasso il pH è neutro e il numero di batteri arriva a 10^7 - 10^{12} /ml. Il microbiota del tratto gastro-intestinale cambia marcatamente dal duodeno all'ileo a causa di un incremento del pH, portando ad un incremento della carica microbica. Il numero e la diversità di specie batteriche nel tratto gastro-intestinale, oltre ad essere influenzati dal pH, sono influenzati anche dalla peristalsi, dal tempo di transito,

dalla disponibilità di nutrienti, dall'età e dallo stato di salute dell'ospite e dalla secrezione di mucina (Lin CS. *et al.* 2014). Oltre il 90% delle specie caratterizzate appartiene a due *phyla* batterici: Batteroiditi e Firmicuti, mentre in misura minore si ritrovano Proteobatteri e Attinobatteri, in ogni caso a livello di specie il microbiota intestinale esibisce una ampia variabilità tra gli individui. Tra i principali colonizzatori del tratto gastro-intestinale vi sono i Lattobacilli, mentre i Bifidobatteri sono i primi colonizzatori dell'intestino dei neonati e persistono a livelli più bassi in quello degli adulti. Lattobacilli e Bifidobatteri sono definiti probiotici, ossia microrganismi vivi che, quando somministrati in adeguate quantità, apportano benefici all'ospite (Reid G. *et al.* 2003). Librerie di rRNA 16S di campioni fecali adulti dimostrano che *Lactobacillus ruminis* è la specie intestinale predominante, anche se molte altre specie di lattobacilli sono presenti come *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* e *Leuconostoc argentinum*. In aggiunta, vengono ritrovati batteri associati al cibo come *L. sakei*, *L. curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Pediococcus pentosaceus*. Invece, campioni fecali di bambini comprendono *L. acidophilus*, *L. casei/paracasei* e *L. salivarius* (Vaughan EE. *et al.* 2005). In condizioni di benessere, il microbiota si trova in uno stato di “normobiosi”

in cui i microrganismi con effetti benefici sulla salute predominano sulle specie patogene. Questa situazione è cruciale per l'omeostasi intestinale. Cambiamenti nella composizione microbica dell'intestino, noti come disbiosi, possono compromettere lo stato di salute dell'ospite (figura 1). Il microbiota regola i livelli di energia assimilabile e il metabolismo, la neutralizzazione di farmaci e di agenti carcinogeni, la modulazione della motilità intestinale, l'immunità e la protezione da patogeni. L'incapacità di regolare l'immunità mucosale intestinale può risultare in un'inflammatione locale e sistemica. In particolare, i microrganismi possono stimolare la produzione di citochine pro-infiammatorie; ad esempio, livelli bassi e persistenti di inflammatione in differenti organi contribuiscono al diabete, alle patologie cardiache e all'obesità (Schipa S. *et al.* 2014). Infine, è dimostrata la presenza in diversi soggetti di un “core funzionale” di geni, chiamato “microbioma variabile umano” e che dipende dalla combinazione di fattori specifici dell'ospite, come il genotipo, lo stato fisiologico, le patologie dell'ospite, lo stile di vita, la dieta e l'ambiente (Turnbaugh PJ. *et al.* 2009).

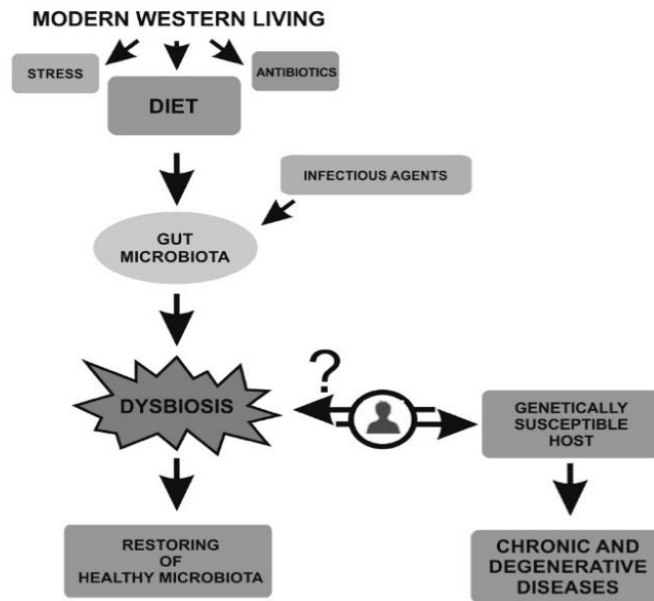


Figura 1 Fattori che innescano la disbiosi (Schipa S. *et al.* 2014).

1.1.2 Funzioni metaboliche

Fattori genetici e ambientali influenzano l'abbondanza e il tipo di batteri patogeni e non patogeni nell'intestino. La dieta influenza la composizione della flora intestinale e i successivi prodotti di fermentazione che a loro volta influenzano l'ospite. Alcuni prodotti di fermentazione e metaboliti promuovono le funzioni intestinali, altri compromettono tali processi, alterando la digestione e le funzioni della barriera intestinale. Il microbiota intestinale ha sviluppato una riserva di enzimi che facilitano la degradazione del cibo e l'utilizzo dei nutrienti (Lin CS. *et al.* 2014). A tale riguardo, studi sui

profili metabolici di uomo e topo rivelano che l'assorbimento, il deposito e il metabolismo dei lipidi possono essere specificamente modulati dal microbiota. Esso è capace di trasformare potenzialmente componenti carcinogeni, come le amine eterocicliche, e attivare componenti bioattivi. Infatti, la produzione di acidi grassi a catena corta può influenzare positivamente la proliferazione delle cellule epiteliali intestinali e la differenziazione. Il butirrato, ad esempio, può rafforzare la barriera difensiva, inducendo la secrezione di mucina e di peptidi anti-microbici; esso esercita molteplici effetti come l'inibizione del ciclo cellulare, l'induzione della morte cellulare programmata e la differenziazione cellulare (Saemann MD. *et al* 2002). Inoltre, il microbiota è coinvolto anche nella riduzione del nitrato (NO_3) a ossido nitrico (NO). In un recente studio si è dimostrato che la somministrazione intra-rettale di NO, in topi con colite indotta da sodio destrano solfato, ha effetti anti-infiammatori, malgrado per anni l'ossido nitrico sia stato ritenuto dannoso per il metabolismo energetico delle cellule del colon (Chung H. *et al.* 2010).

1.2 I batteri lattici e la produzione di molecole anti-microbiche

1.2.1 Le batteriocine

La capacità del microbiota di prevenire la colonizzazione di patogeni avviene mediante la competizione per i siti di attacco e per i nutrienti e attraverso la produzione e la secrezione di molecole anti-microbiche. Attraverso questo meccanismo il microbiota intestinale protegge se stesso dall'attacco di microrganismi esogeni (Vaishnava S. *et al.* 2008). Tra le principali molecole anti-microbiche prodotte dai batteri acido lattici vi sono le batteriocine. Esse comprendono un'ampia famiglia di peptidi che mostrano attività anti-microbica principalmente contro *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. Negli ultimi dieci anni l'interesse nella ricerca sulle batteriocine, specialmente prodotte da batteri acido lattici, ha avuto un grande sviluppo viste le potenzialità di utilizzo sia come conservanti naturali nei cibi, che un utilizzo terapeutico. Le batteriocine sono resistenti a forti stress termici e sono attive in un ampio intervallo di pH. Un'importante peculiarità è la difficoltà dei batteri a sviluppare resistenza ad esse; una ragione è che esse hanno un rapido meccanismo d'azione, con la formazione di pori nella membrana dei batteri. Le batteriocine agiscono a concentrazioni estremamente basse,

nell'ordine del nanomolare rispetto a molti antibiotici che esplicano la loro azione nell'ordine del micromolare. Inoltre, essendo generalmente sensibili alle proteasi, vengono facilmente degradate; questo significa che non permangono a lungo nell'ambiente e quindi è meno favorito lo sviluppo di resistenze da parte dei batteri. Infine, le batteriocine sono altamente specifiche contro patogeni clinici, inclusi ceppi resistenti a molti antibiotici (MDR, *multi drug resistant*) (Cotter PD. *et al.* 2013).

1.2.2 Classificazione delle batteriocine

Vari criteri sono stati utilizzati per classificare le batteriocine da batteri *Gram* positivi, inclusi i batteri acido lattici. In accordo a uno schema proposto da Cotter e collaboratori nel 2005, le batteriocine sono raggruppate in tre categorie: classe I (lantibiotici), classe II (batteriocine che non contengono lantionina) e classe III (batteriolisine). Heng e collaboratori nel 2007 propongono un'ulteriore modifica in cui le batteriocine circolari possono essere raggruppate in una classe differente. I lantibiotici sono piccoli peptidi (<5kDa) modificati post-traduzionalmente, come lantionina e 3-metil-lantionina. Le batteriocine di classe II sono piccoli peptidi (<10kDa), stabili al calore. Quest'ultimo gruppo può essere

ulteriormente suddiviso in quattro sottoclassi: la classe IIa, *pediocine-like*, ha una distinta sequenza conservata (YGNGVXC) nella regione N terminale, che è responsabile dell'efficacia anti-microbica contro *Listeria monocytogenes* e altre specie di batteri *Gram* positivi; la classe IIb consiste di due peptidi che lavorano sinergicamente per essere completamente attivi; la classe IIc ha le estremità N e C terminali legate covalentemente per dare al peptide una struttura circolare estremamente stabile; le rimanenti batteriocine rientrano nella sottoclasse IId. La biosintesi dei lantibiotici inizia con la traduzione del pre-peptide, che consiste di un peptide leader e di un pro-peptide. Il pre-peptide poi subisce delle modifiche mentre il peptide leader è tagliato proteoliticamente da specifici enzimi. Per quanto riguarda i non lantibiotici il peptide *leader* serve come sito di riconoscimento che dirige il pre-peptide verso la maturazione e protegge il ceppo produttore, mantenendo la batteriocina in uno stato inattivo mentre è in esso. La Nisina A da *Lactococcus lactis* è il principale rappresentante della classe I; mentre per quanto riguarda i membri di classe II, annoveriamo l'Enterocina NKR da *Enterococcus faecium* per la classe IIa, la Lactococcina Q da *Lactobacillus lactis* per la classe IIb; tra le batteriocine circolari della classe IIc vi è la Lactociclina Q da *Lactococcus sp. QUI2*, la Leucociclina Q

di *Leuconostoc mesenteroides*. Infine, la Lacticina Q e la Lacticina Z da *L. lactis* sono le più rappresentative della classe IId (Perez RH. *et al.* 2014). Tra le batteriocine prodotte dai *Gram* positivi, una delle più studiate è la Gassericina A isolata da *L. gasseri* LA39, poichè è il primo esempio di proteina circolare da batteri acido lattici. Essa è attiva contro molti patogeni come *L. monocytogenes*, *B. cereus* and *S. aureus*. Ha una struttura stabile anche dopo riscaldamento per 60 minuti a 100°C ed è attiva in un *range* di pH tra 2 e 12. Inoltre, più del 74% dei residui di Gassericina A sono idrofobici; è leggermente solubile in acqua, mentre la solubilità incrementa in acetonitrile o alcol. Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, essa agisce direttamente nella membrana citoplasmatica della cellula bersaglio e causa morte cellulare mediante efflusso di ioni potassio (Kawai Y. *et al.* 1994). Le batteriocine prodotte dai *Gram* negativi sono proteine maggiori di 20kDa, suddivise in due gruppi: colicine e microcine. Le prime uccidono i loro *targets* mediante permeabilizzazione della membrana o mediante degradazione degli acidi nucleici (Braun V. *et al.* 1994; Riley MA and Wertz JE 2002; Smarda and Smajs 1998). Le microcine hanno caratteristiche comuni alle batteriocine prodotte dai *Gram* positivi, come la termostabilità, l'idrofobicità e la resistenza ad alcune proteasi

e a pH estremi. Esse esercitano la loro funzione mediante depolarizzazione della membrana (Gaillard-Gendron S. *et al.* 2000).

1.2.3 Ottimizzazione e fattori che influenzano la produzione di batteriocine.

Molti lavori mostrano che specifici mezzi di coltura e fattori fisici ben controllati, come pH e temperatura, sono richiesti per ottenere la maggiore produzione di batteriocine. La produzione delle batteriocine è solitamente studiata in terreni ricchi complessi e i parametri che vengono più spesso considerati sono la fonte carboniosa e fonte azotata. In un interessante lavoro viene investigata l'influenza di varie condizioni di coltura e di vari componenti sulla produzione di batteriocine dal sopranatante di *Lactobacillus sp.* MSU3IR attive contro i patogeni ittici. Tale ceppo di Lattobacillo, cresciuto in terreno ricco presenta la maggiore attività antimicrobica alla fine della fase stazionaria. La bio-attività del sopranatante si annulla dopo il trattamento con proteinasi K, α -chimotripsina e tripsina, mentre la catalasi non ha alcun effetto. Il pH ottimale per la produzione di batteriocine dal ceppo *Lactobacillus sp.* MSU3IR è 5.0. Invece, la temperatura ottimale è di 30°C. Se si considerano i

componenti del terreno, l'aggiunta di lattosio nei mezzi di coltura favorisce la maggiore resa di molecole antimicrobiche da parte di *Lactobacillus sp.* MSU3IR, mentre la minima attività anti-microbica si osserva supplementando il mannitolo. Nel valutare gli effetti della fonte azotata, l'ammonio acetato favorisce la maggiore produzione di batteriocine. La massima resa si ottiene anche aggiungendo NaCl 3% al terreno di coltura. Probabilmente il cloruro di sodio potrebbe alterare l'osmolarità della membrana cellulare del batterio, favorendo una maggiore estrusione di batteriocine dalla cellula. Anche il Tween 80 gioca un ruolo chiave poichè potrebbe cambiare la tensione superficiale della cellula produttrice, incrementando il rilascio di batteriocine. Le batteriocine prodotte da *Lactobacillus sp.* MSU3IR hanno una massa di 39.26 kDa e 6.38 kDa (Iyapparaj P. *et al.* 2013). La produzione di molecole antimicrobiche da parte dei batteri acido lattici è, dunque, influenzata da una serie di variabili, tutte importanti al fine di ottenere la massima resa di tali molecole attive contro batteri patogeni. Ad esempio, vi è una stretta connessione tra la fonte carboniosa e la produzione di Nisina da *L. lactis subsp. lactis* NIZO 22186. Il saccarosio sembra essere il principale fattore che controlla il meccanismo di produzione di tale batteriocina. La biosintesi della Nisina ha luogo durante la

fase esponenziale e si blocca quando le cellule entrano in fase stazionaria (De Vuyst L. and Vandamme JE. 1992). Il pH, invece, è un fattore cruciale per la produzione di Lactocina S da *Lactobacillus sake* L45; la massima resa si ottiene quando le cellule sono cresciute a pH 5.0, mentre una bassa resa si ha quando il pH iniziale è 6.0. L'aggiunta di etanolo, inoltre, incrementa di due o quattro volte l'attività della Lactocina S. Essa è molto idrofobica, pertanto solventi organici come l'etanolo potrebbero dissociare gli aggregati, incrementando l'attività di tale batteriocina. La Lactacina B è prodotta da *Lactobacillus acidophilus* a pH 6.0 ma non a pH 6.6 o 5.4, mentre la maggiore produzione di Elveticina J da *Lactobacillus helveticus* 481 si ha a pH 5.0. La forte dipendenza della produzione di batteriocine dal pH potrebbe suggerire che l'espressione di geni biosintetici può essere regolata proprio dal pH (Jimenez-Diaz R. *et al.* 1993).

1.3 I Peptidi anti-microbici (AMPs) e altre molecole prodotte dai batteri lattici.

In letteratura ci sono vari esempi di produzione da parte dei batteri acido lattici di innumerevoli peptidi anti-microbici, chiamati AMPs (come le batteriocine sopra discusse), utilizzati sia in campo alimentare che in applicazioni. Alcuni

ricercatori londinesi nel 2009 hanno isolato, identificato e caratterizzato un nuovo peptide anti-microbico (AMP) prodotto da *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 3177402, attivo contro un ampio *range* di patogeni *Gram* positivi e negativi. Tale peptide è l'acidocina LCHV, estremamente stabile al calore, l'attività non è alterata nemmeno dopo trattamento a 130°C per 90 minuti. La stabilità al pH è valutata in un intervallo di pH tra 3 e 8; il peptide è molto attivo a valori di pH compresi tra 3 e 6,5. Tuttavia, perde attività dopo trattamento con enzimi proteolitici, data la sua natura proteica. Tale peptide è molto piccolo, 1100 Dalton ed ha una sequenza di 11 residui (Mkrtchyan H *et al.* 2010). Inoltre, studi in vivo su *Drosophila melanogaster* hanno dimostrato che il peptide LR₁₄ derivato da *Lactobacillus plantarum* LR/14 è un potente agente larvicida, con proprietà dose-dipendente. Tuttavia, il possibile ruolo degli AMPs da batteri acido lattici come agenti tossici contro sistemi eucariotici resta ancora poco esplorato (Gupta R. *et al.* 2014). Nel soprannatante di *Lactobacillus* GG sono stati isolati, identificati e caratterizzati sette piccoli peptidi con un peso molecolare di circa 1kDa; di questi sette, due (NPSRQERR e PDENK) hanno attività anti-microbica comparabile a quella del soprannatante completo. In particolar modo essi sono attivi contro *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* ed in parte anche

contro *S. aureus* (Lu R. *et al.* 2009). Tuttavia, i batteri lattici producono oltre ad un largo numero di peptidi, altri due principali tipi di molecole anti-microbiche: acido lattico e H_2O_2 . In un lavoro di Gong Z. e collaboratori del 2014 viene dimostrata l'inattivazione di *Chlamydia trachomatis* da parte di mezzi condizionati di *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii*, che dominano il microbioma vaginale. L'acido lattico prodotto da tali microrganismi porta alla morte di *C. trachomatis* in maniera tempo e concentrazione dipendente. Tuttavia la neutralizzazione dei mezzi acidi reverte completamente l'effetto. Infatti, l'acidità generata dai lattobacilli è fondamentale per inattivare il patogeno mentre le concentrazioni di H_2O_2 sono insufficienti per inattivare la clamidia. L'aerazione delle colture di lattobacilli induce la produzione di H_2O_2 ma inibisce fortemente la crescita batterica e la produzione di acido lattico. Dunque, i lattobacilli inattivano *C. trachomatis* attraverso il mantenimento dell'acidità in un ambiente ipossico nel lume vaginale con limitata presenza di H_2O_2 (Gong Z. *et al.* 2014). I batteri acido lattici sono noti anche per la produzione di molecole con proprietà anti-fungine come fenillattato da parte di *L. plantarum* (Strom K. *et al.* 2002) oppure i dipeptidi ciclici, cyclo (L-Leu-L-Pro) e cyclo (L-Phe-L-Pro) di *L. plantarum* FST1.7 (Dalbello F. *et al.* 2007). E' noto anche

che il sopranatante di *L. casei* AST18 ha, oltre ad acido lattico, tre potenziali sostanze antifungine con basso peso molecolare (<1kDa): cyclo-(Leu-Pro); 5,10-Diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrolo[1,2-a;1',2'-d]pyrazine; 2,6-diphenyl-piperidine (Li H. *et al.* 2012).

1.4 L'omeostasi intestinale.

Molti studi dimostrano che i batteri commensali, che compongono il microbiota intestinale, stabiliscono complesse interazioni simbiotiche con le cellule del tratto gastro-intestinale e tali interazioni sono essenziali per il benessere dell'organismo (Clemente JC *et al.* 2012; Kau AL. *et al.* 2011). I probiotici hanno la capacità di influenzare e modulare la proliferazione cellulare, l'apoptosi e l'infiammazione, e posseggono proprietà utili per future applicazioni immuno-modulatorie e di prevenzione al cancro. Studi *in vitro* riportano gli effetti anti-proliferativi e pro-apoptotici di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium spp.* in varie linee di cancro. Mentre studi *in vivo* hanno dimostrato l'attività inibitoria dei probiotici su fegato, vescica e tumori al colon in modelli animali (Matsumoto M. *et al.* 2011). Molecole di *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) prevengono l'apoptosi indotta da citochine in due differenti sistemi

cellulari (YAMC-*young adult mouse colon*; HT29-colon carcinoma). Colture di LGG attivano Akt/ *protein Kinase B*, che ha effetti anti-apoptotici e inibiscono l'attivazione di p38/*mitogen activated protein Kinase*, che è un pro-apoptotico, da parte del *tumor necrosis factor* (TNF), dell'interleuchina-1 α (IL-1 α) o dell'interferone γ (INF- γ) (Fang Y. and Polk D.B. 2002). Il probiotico *L. reuteri* promuove l'apoptosi indotta da TNF in cellule derivate da leucemia mieloide umana, inibendo l'attivazione dei prodotti genici dipendenti dal fattore nucleare NF-kB, come Cox-2 e Ciclina D1, che mediano la proliferazione cellulare, e Bcl-2, Bcl-xL, che mediano la sopravvivenza cellulare. In aggiunta, *L. reuteri* promuove l'apoptosi indotta da TNF, inducendo la fosforilazione delle *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK), *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) e p38; al contrario, sopprime l'attivazione della MAPK *Extracellular Signal-Regulated Kinases* (ERK 1/2) (Iyer C. *et al.* 2008). Di Luccia e collaboratori nel 2013 hanno studiato gli effetti di molecole prodotte e secrete da *Lactobacillus gasseri* su cellule intestinali HCT116. *Lactobacillus gasseri* è un ceppo umano che può essere isolato da biopsie ileali di individui sani. Le molecole prodotte da tale ceppo stimolano un arresto del ciclo cellulare alla fase G1 mediante una sovra-regolazione di p21WAF1, proteggendo le cellule dall'apoptosi. Inoltre,

hanno analizzato l'espressione di p21WAF1 e p-ERKs per capire gli effetti del sopranatante di tale ceppo a livello molecolare. p21WAF1 è un regolatore della progressione del ciclo cellulare; mentre le chinasi ERK1/2 possono mediare sia la proliferazione cellulare che l'apoptosi. ERKs attivate (fosforilate) sono solitamente associate con una proliferazione cellulare attiva, mentre l'incremento di p21 correla con un arresto del ciclo cellulare in G1. Il trattamento con il sopranatante significativamente induce p21WAF1 indipendentemente dal TNF α , mentre l'espressione di p-ERKs è inibita in cellule trattate con il sopranatante, supportando l'effetto anti-proliferativo delle molecole di *L. gasseri* (Di Luccia B. *et al.* 2013). Sulla scorta di tutti i dati relativi alla secrezione di molecole da parte di probiotici e batteri commensali, che possono contribuire al mantenimento dell'omeostasi intestinale, è stato isolato un componente citoprotettivo da *L. brevis* SBC8803. Tale ceppo ha la capacità di indurre le HSP (*heat shock proteins*) nell'intestino tenue di topo, di proteggere i tessuti da stress ossidativo e di migliorare i danni intestinali in un modello di topo con colite. La molecola nel sopranatante di *L. brevis* SBC8803, capace di indurre HSP27 nella linea cellulare Caco2/BBE, è il polifosfato, un comune prodotto di Lattobacilli e altri batteri associati con la microflora intestinale. L'effetto protettivo del

polifosfato è mediato dall'attivazione di p38 MAPK. Funge da mediatore del polifosfato la via di segnale integrina-p38 MAPK. Le integrine sono una famiglia di recettori che mediano l'adesione cellulare alle molecole extracellulari e sono associate con p38 MAPK. Poichè il polifosfato non riesce ad attraversare le giunzioni strette delle cellule epiteliali a causa del suo alto peso molecolare, tale studio propone per la prima volta le integrine come nuovi sensori per le molecole rilasciate dai probiotici, contribuendo alle loro funzioni benefiche, rispetto a molti lavori di letteratura che illustrano come le molecole prodotte dai batteri che mediano le interazioni ospite-microrganismo siano riconosciute dai Recettori *Toll Like*. Pertanto, il polifosfato incrementa la funzione della barriera intestinale attraverso l'interazione con l'integrina $\beta 1$, seguita dall'attivazione di p38 MAPK. In aggiunta il polifosfato migliora i danni epiteliali al colon di topi con colite indotta da Sodio Solfato Destrano (DSS), illustrando che esso è un promettente agente per prevenire ed alleviare le infiammazioni intestinali (Segawa S. *et al.* 2011). Il microbiota intestinale, oltre a modulare la proliferazione cellulare e l'apoptosi, è in grado di regolare una serie di processi infiammatori intestinali. In particolare, i lipopolisaccaridi intestinali (*Gut-derived lipopolysaccharides*) sono critici per lo sviluppo e la

progressione di un'ampia varietà di infiammazioni croniche (Cani P. *et al.* 2007). Essi rientrano nella categoria di “*patterns* molecolari associati ai patogeni”, tale categoria, nota come PAMPs, comprende elementi strutturali espressi non solo da batteri ma anche da virus e funghi. I PAMPs stimolano i *Toll like receptors* (TLRs), i quali sono recettori espressi dalle cellule del sistema immunitario innato, innescando l'espressione di citochine pro-infiammatorie. Molti PAMPs interagiscono con particolari TLRs; per esempio, l'eterodimero TLR2/TLR6 può essere stimolato da alcuni componenti batterici, come l'acido lipoteicoico (LTA) e il peptidoglicano (PG), invece il DNA virale stimola il TLR9. Il TLR4 è un importante sensore per il lipopolisaccaride (LPS), il quale è uno dei più studiati componenti immunomodulatori dei batteri e può indurre infiammazione sistemica e sepsi. LPS è un importante componente strutturale della membrana esterna dei *Gram* negativi e consiste di tre parti: il Lipide A, un *core* oligosaccaridico e l'antigene O. La stimolazione delle cellule di mammifero da parte dell'LPS avviene attraverso una serie di interazioni con molte proteine. In particolare LPS interagisce con *LPS binding protein* (LBP) e tale interazione facilita l'associazione tra LPS e CD14. Il CD14, una proteina ancorata al glicosilfosfatidilinositolo, a sua volta favorisce il

trasferimento dell'LPS al complesso TLR4/MD-2. MD-2 è una proteina solubile, la quale si associa in maniera non covalente con il TLR4 e in sua assenza può formare un complesso con LPS. Dunque, la stimolazione del TLR4 da parte dell'LPS include la partecipazione di molte molecole come mostrato in figura 2.

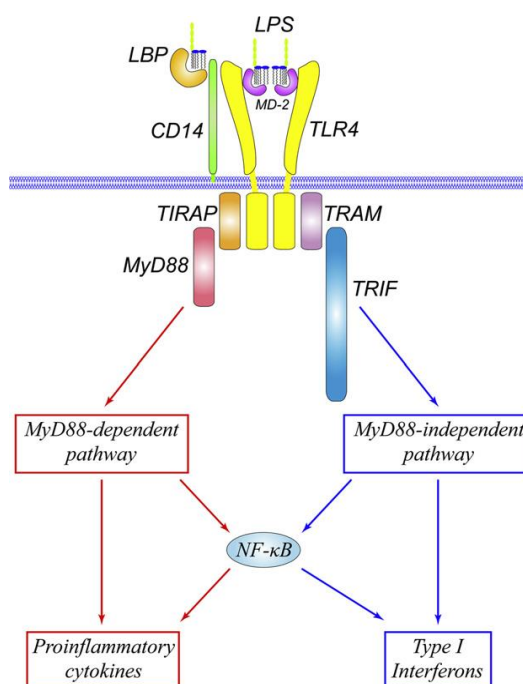


Figura 2 Interazione LPS/TLR4 (Lu YC. *et al.* 2008).

Dopo l'interazione con LPS il TLR4 oligomerizza e recluta degli adattatori a valle attraverso l'interazione con il dominio TIR (*Toll-interleuchin-1-receptor*); il dominio TIR è critico per la trasduzione del segnale poichè una singola mutazione in esso può abolire la risposta all'LPS. La via del segnale del

TLR4 è suddivisa nel *pathway* Myd88-dipendente e MyD88-indipendente. Nella via MyD88 dipendente un importante adattatore a valle di IRAK1 e IRAK4 è TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) il quale attiva TAK1 (*transforming growth factor- β -activated Kinase 1*). TAK1 attiva a sua volta le vie IKK (*I κ B kinase*) e MAPK. IKK α , IKK β e IKK γ formano un complesso e fosforilano I κ B. Questa fosforilazione porta alla degradazione delle proteine I κ B e alla successiva traslocazione nel nucleo del fattore trascrizionale NF- κ B, che controlla l'espressione di citochine pro-infiammatorie. Invece, l'attivazione della via delle MAPKs porta all'induzione di un altro fattore trascrizionale AP-1, il quale ha anch'esso un ruolo nell'espressione di citochine pro-infiammatorie (figura 3A). Per quanto riguarda la via MyD88 indipendente, TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β*) gioca un ruolo chiave nell'attivazione di NF- κ B e MAPK (figura 3B) (Lu YC. *et al.* 2008).

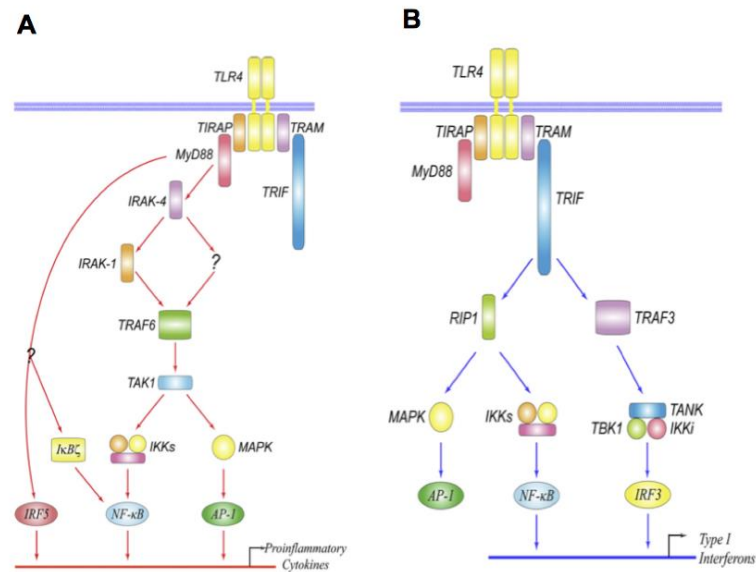


Figura 3 A) Via del segnale MyD88-dipendente; B) Via del segnale MyD88-indipendente (Lu YC. *et al.* 2008).

Recenti lavori hanno dimostrato il coinvolgimento del microbiota intestinale nella modulazione dei processi infiammatori innescati dai PAMPs. Ad esempio, *Lactobacillus jensenii* riduce i livelli di mRNA di citochine pro-infiammatorie, inibendo l'attivazione del TLR4 indotta da patogeni in cellule epiteliali intestinali porcine (Shimazu T. *et al.* 2012). Un altro ceppo di *L. jensenii* (TL2937) ha la capacità di sottoregolare la produzione di IL-6 e IL-8 in cellule epiteliali intestinali porcine in risposta ad LPS (figura 4) (Villena J. Kitazawa H. 2014). *Lactobacillus amylovirus* 16698, un ceppo isolato dall'intestino di maiali, è in grado di

contrastare lo stimolo infiammatorio innescato dall'enterotossigenico *E. coli* (ETEC) K88 nell'intestino attraverso l'inibizione della via di segnale del TLR4 e la modulazione di regolatori negativi. In particolare, alcuni ricercatori usano un modello *in vitro* di cellule intestinali e un modello *ex vivo* di espianti da maiali che meglio mimano l'ambiente intestinale mucosale. Essi trovano sia nelle cellule Caco-2/TC7 che negli espianti intestinali che *L. amylovirus* e il suo sopranatante sono capaci di inibire differenti stadi di segnalazione del TLR4 attivati da ETEC K88 e la produzione di citochine infiammatorie attraverso la modulazione di regolatori negativi come *Toll-interacting protein* (Tollip) e IRAK-M, così come la sotto-regolazione di Hsp72 e Hsp90 (Finamore A. *et al.* 2014). Inoltre, l'acido lipoteicoico isolato e purificato da *L. plantarum* (pLTA), è molto efficace nell'inibire la produzione di TNF- α indotta da LPS in cellule THP-1 (*Human monocyte-like cells*). Esso è molto più efficace nonché sicuro per la prevenzione di patologie infiammatorie, senza alcuna preoccupazione circa gli effetti collaterali come shock settico, che può avvenire per ligandi patogeni come LPS oppure LTA e PG da *S. aureus*. Si è anche esaminato il ruolo del pre-trattamento con pLTA sull'espressione dei PRRs (*pattern recognition receptors*), ossia dei recettori che riconoscono i PAMPs. In particolare, i

livelli di mRNA di TLR4, NOD1 e NOD2 sono sotto-regolati in cellule THP-1 pretrattate con pLTA per 18 ore e stimulate con LPS per 2 ore. Dato che TLR4, NOD1 e NOD2 contribuiscono allo shock settico, la *down-regolazione* di questi recettori da parte del pLTA può essere collegata all'inibizione dello shock settico indotto da LPS. Inoltre, la sovra-regolazione di IRAK-M in seguito a pretrattamento con pLTA gioca un ruolo importante come regolatore negativo per il *signaling* del TLR4 e per inibire la produzione di TNF- α indotta da LPS (Kim HG. *et al.* 2008). Infine, *B. longum subsp. infantis* dimostra una fortissima capacità di ridurre la concentrazione colonica di LPS, per poi diminuire la secrezione di citochina pro-infiammatoria TNF- α e per incrementare quella della citochina anti-infiammatoria IL-4 in cellule di macrofagi. Quindi, ceppi probiotici di Lattobacilli e Bifidobatteri sono di straordinaria importanza in quanto possono diminuire le concentrazioni di LPS nel colon, le quali ulteriormente riducono il tono pro-infiammatorio (Rodes L. *et al.* 2013).

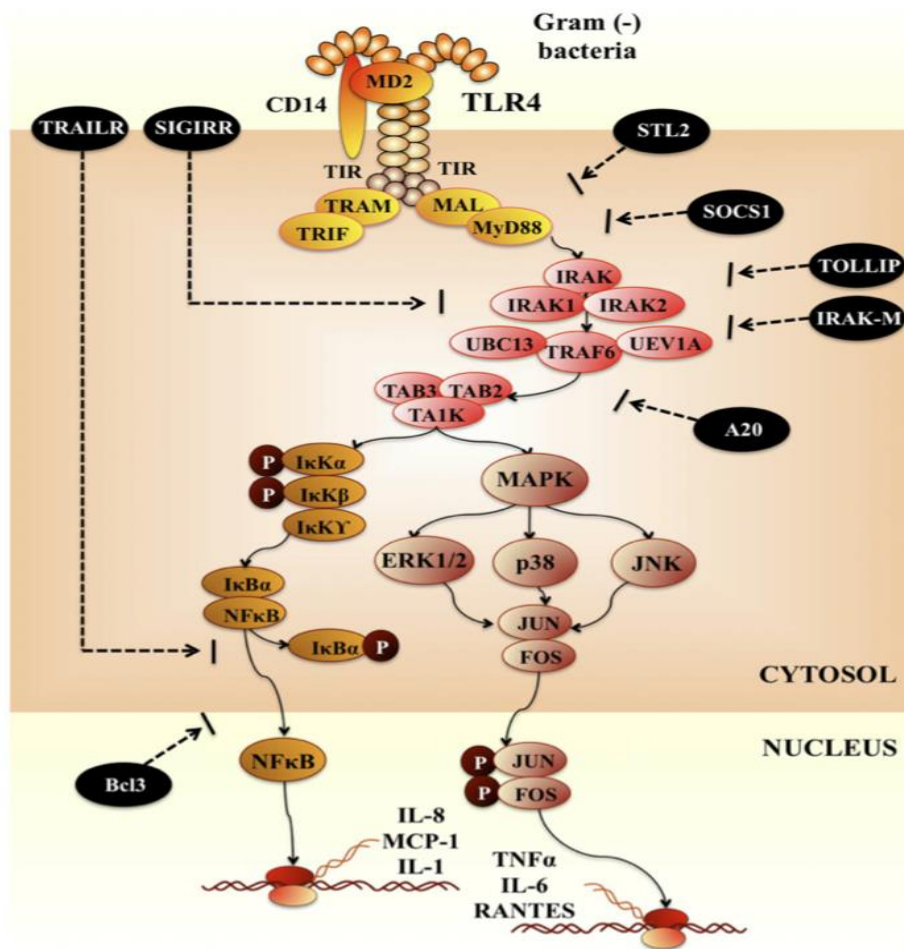


Figura 4 Via del segnale del TLR4 (Villena J. and Kitazawa H. 2014).

1.5 Il microbiota polmonare e le sue connessioni con quello intestinale.

Studi compiuti negli ultimi anni dimostrano che anche il tratto respiratorio umano ospita un microbiota locale. Esso subisce non solo influenze da parte dell'ambiente, ma anche dal microbiota intestinale, anche cambiamenti del tipo di

nutrizione possono avere impatti sulla composizione di tale microbiota (Madan *et al.* 2012). I prevalenti *phyla* identificati nelle vie aeree sono Proteobatteri, Firmicuti e Batteroiditi. Studi a livello di genere confermano la presenza predominante di *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria*, *Veillonella*, *Haemophilus* così come *Neisseria*, essi costituiscono il “*core airway microbiota*” cioè fanno parte della flora commensale e non sono dannosi per individui immuno-sufficienti, Alcuni ricercatori, usando tecniche di broncoscopia, hanno dimostrato che la maggior parte delle specie batteriche presenti nelle vie aeree più basse riflette la *cross-contaminazione* da parte delle vie aeree più alte. Studi su più vasta scala sono senza dubbio necessari per una più dettagliata caratterizzazione del microbiota e per conoscere la sua distribuzione nei differenti compartimenti del polmone. In letteratura è noto che il microbiota intestinale può contribuire all'omeostasi dell'intestino stesso (Round e Mazmanian, 2009), mentre non vi è alcuna evidenza che il microbiota polmonare possa avere una funzione simile a sviluppare e mantenere lo *steady-state* del polmone. Molti studi dimostrano un'associazione stretta tra il microbiota polmonare e una varietà di patologie croniche del polmone, così come accade per il microbiota intestinale. Il crescente uso di antibiotici così come cambiamenti nello stile di vita

possono portare ad alterazioni nella composizione microbica e tali condizioni sono strettamente legate ad una serie di patologie, come ad esempio un più alto rischio di sviluppo dell'asma. Il fenotipo asmatico è caratterizzato da una riduzione in Lattobacilli e Bifidobatteri, inoltre, è evidente una chiara differenza tra la composizione del microbiota di un individuo sano, comparata a quella di uno asmatico. Le vie aeree dei soggetti asmatici hanno un significativo incremento in Proteobatteri, specialmente ceppi potenzialmente patogeni come *Haemophilus*, *Moraxella* e *Neisseria spp.* Mentre ceppi del *phylum* Batteroiditi, specialmente *Prevotella spp.*, sono poco rappresentati. La carica e la diversità batterica sono molto più alte nelle vie aeree dei pazienti asmatici con iperreattività bronchiale rispetto agli individui sani. Comunque, per stabilire una precisa correlazione tra i cambiamenti nella composizione microbica delle vie aeree e la presenza o assenza di condizioni asmatiche saranno necessari ulteriori studi e approfondimenti (Gollwitzer ES. *et al.* 2014). Inoltre l'evidenza del diretto contributo del microbiota sulle malattie allergiche delle vie aeree è nata da studi con topi *germ-free*, che sono completamente sterili e non ospitano microbi. Tali topi mostrano una forte infiammazione aerea, caratterizzata da un incremento delle cellule T *helper*. Tale effetto può

essere superato dalla colonizzazione di topi *germ-free* con un normale microbiota; tuttavia, se tale fenomeno sia dovuto alla colonizzazione delle vie aeree o se vi è l'influenza del microbiota intestinale resta da comprendere (Herbst *et al.* 2011). Infine, si è visto che la diretta somministrazione di batteri innocui alle vie aeree sembra esercitare un effetto protettivo contro lo sviluppo dell'infiammazione allergica di tali vie (Gollwitzer ES. *et al.* 2014) (figura 5). La COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*, è una malattia progressiva del polmone e delle vie aeree caratterizzata da bronchite ed enfisema. Di recente si è dimostrato che il microbiota di individui con COPD ha caratteristiche simili a quelle trovate in pazienti asmatici, con un'alta prevalenza di Proteobatteri e Firmicuti, specialmente Lattobacilli. Ad ogni modo tante sono le teorie, anche discordanti, circa la composizione e la diversità batterica in pazienti COPD. (Gollwitzer ES. *et al.* 2014). Un'altra grave malattia che interessa i polmoni è la Fibrosi Cistica, essa è causata da una mutazione nel gene *cf* che codifica una proteina che funziona come canale per il cloro detta CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*). Una delle maggiori conseguenze di tale malattia è una ricorrente infezione polmonare, la quale porta ad una progressiva perdita della funzione dei polmoni. I quattro principali ceppi legati a tali

infezioni sono: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae* e *B. cepacia*. Studi sul microbiota polmonare di pazienti FC (*Cystic Fibrosis*) rivelano una predominante colonizzazione delle vie aeree più basse con questi quattro ceppi. Inoltre, comparando pazienti FC di età diverse vi è una perdita età-dipendente della ricchezza e della diversità del microbiota, associata con una perdita delle funzioni polmonari. Il microbiota polmonare in pazienti FC può essere suddiviso in taxa “core” e “satellite”. Il “core” include *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Veillonella* con una significativa prevalenza di *P. aeruginosa*. La composizione di tale “core” è strettamente influenzata dal trattamento di antibiotici, mentre nessuna correlazione può essere fatta con la composizione del gruppo “satellite” (Gollwitzer ES. *et al.* 2014). Negli ultimi anni diversi studi hanno riguardato la modulazione della microflora intestinale come potenziale terapia nelle patologie croniche infiammatorie respiratorie. Infatti, studi clinici valutano gli effetti dei probiotici sulle infiammazioni allergiche. Molti ceppi di lattobacilli, *L. casei*, *L. acidophilus* L-92, *L. paracasei*-33, sono utilizzati per il loro impatto sulle riniti allergiche, dimostrando l'effetto benefico della somministrazione di latte supplementato con lattobacilli vivi. Inoltre, *L. gasseri* A5 o una combinazione di *L. acidophilus*,

B. Bifidum e *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*, somministrati in capsule, diminuiscono la gravità dei sintomi e migliorano la funzione polmonare dei bambini asmatici (Chen *et al.* 2010; Gutkowski *et al.* 2010). L'effetto benefico dei probiotici è largamente ceppo dipendente, così la somministrazione orale di *L. reuteri* ma non di *L. salivarius* diminuisce le infiammazioni allergiche delle vie aeree in topo. In un altro studio murino *E. coli* è stato somministrato per via intra-nasale, indicando che la diretta somministrazione di probiotici alle vie aeree potrebbe essere considerata come un'alternativa al consumo orale (Nembrini C. *et al.* 2011). Infine, poco si sa circa il trattamento di pazienti affetti da COPD o FC con i probiotici. Essi potrebbero essere benefici nel recuperare l'equilibrio microbico come accade per nell'intestino. Ad esempio, la somministrazione orale di *Lactobacillus GG* può ridurre l'incidenza di esacerbazioni polmonari e ridurre l'infiammazione intestinale in pazienti FC (Gollwitzer ES. *et al.* 2014).

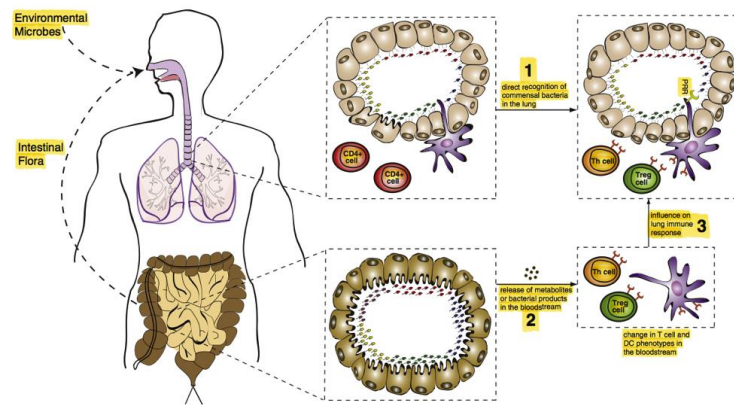


Figura 5 Modulazione della risposta immunitaria polmonare da parte del microbiota commensale (Gollwitzer ES. *et al.* 2014).

1.6 L'azione anti-microbica dei probiotici contro ceppi di *P.aeruginosa*.

Tra il 1975 e il 2003 la frequenza di polmoniti causate da *P. aeruginosa* è cresciuta dal 9.6% al 18.1%, così tale ceppo è diventato a poco a poco la principale causa di infezioni respiratorie acute. Il tasso di mortalità in seguito a polmonite, causata da *P. aeruginosa*, è passato dal 42.1% al 87%. Tale batterio è anche associato con l'80% di mortalità in pazienti FC. Esso è dotato di notevoli fattori di virulenza come presenza di lipopolisaccaridi in membrana esterna, un sistema di secrezione di tipo III e le tossine piocianina ed elastasi. Purtroppo, *P. aeruginosa* è intrinsecamente resistente ad un ampio numero di antibiotici e può acquisire resistenza a molti altri, può anche formare un biofilm che lo protegge dal sistema immunitario dell'ospite e incrementa le difficoltà di

eradicazione in pazienti FC. L'uso di batteri probiotici per prevenire o rallentare la colonizzazione polmonare da parte di *P. aeruginosa*, o eventualmente come approccio terapeutico, per combattere questo tipo di infezioni batteriche, sembra essere particolarmente attrattivo e promettente (Alexandre Y. *et al.* 2014). Lattobacilli isolati dalla cavità orale hanno la capacità di inibire l'attività elastolitica o la formazione di biofilm da parte di *P. aeruginosa*. *Lactobacillus spp.* produce acido lattico e acetico capaci di inibire la crescita del ceppo PAO1 di *P. aeruginosa*. Esso è sensibile ad un decremento di pH con una pronunciata inibizione della crescita a pH 5 e 4. Se si valutano gli effetti dei Lattobacilli sulla formazione del biofilm, cinque ceppi, *L. fermentum* ES.A.2, ES.F.115, ES.A.6a, ES.A. 1A, *L. paracasei* ES.D.88, riducono la formazione del biofilm dopo 7 ore di co-incubazione con PAO1; mentre ceppi di *L. fermentus* e *Lactobacillus zeae* riducono l'attività dell'elastasi dopo co-incubazione col ceppo PAO1 di *P. aeruginosa*. L'elastasi distrugge le giunzioni strette dell'epitelio respiratorio, incrementando i livelli di IL-8, mentre decresce la risposta immunitaria dell'ospite (Alexandre Y. *et al.* 2014). Inoltre, un ceppo di *L. acidophilus*, isolato dalle feci di un paziente di età inferiore a 10 anni, mostra una forte e invariata attività antimicrobica (CFU/ml) per 72 ore contro isolati clinici di *P. aeruginosa*

(Jamalifar H. *et al.* 2011). Da questi studi sembra che i lattobacilli siano capaci di inibire la crescita di *P. aeruginosa* e potrebbero agire come microrganismi bio-terapeutici, nonché come ottimi candidati per combattere le infezioni nosocomiali, dovute a ceppi multi resistenti di *P.aeruginosa* (Jamalifar H. *et al.* 2011)

SCOPO e SINTESI

Negli ultimi anni sono stati realizzati molti studi che dimostrano la produzione, da parte dei batteri del microbiota intestinale, di numerosi agenti anti-microbici come: batteriocine, piccoli peptidi, perossido d'idrogeno e acidi organici. Questi batteri e le molecole da essi prodotti competono per i siti di adesione cellulare e inibiscono la produzione di fattori di virulenza (Walker WA. 2008) associati a microrganismi patogeni come, ad esempio, al batterio *P. aeruginosa* (Alexandre Y. *et al.* 2014). Inoltre, i probiotici sono degni di nota anche per la capacità di stabilire complesse interazioni con le cellule del tratto gastro-intestinale e tali interazioni sono essenziali per il benessere dell'organismo (Lozupone CA. *et al.* 2012). In particolare, essi sono in grado di produrre molecole che modulano l'apoptosi, la proliferazione cellulare e l'infiammazione. Lo scopo del mio progetto di dottorato è consistito nello studiare l'attività anti-microbica e le proprietà anti-infiammatorie di una molecola secreta dal ceppo *L. gasseri* SF1109. In primo luogo è stato realizzato uno *screening* di alcuni ceppi di Lattobacilli, disponibili nel laboratorio di Microbiologia

presso cui ho svolto la mia attività di dottorato, per la produzione di molecole anti-microbiche. Tali ceppi, isolati da biopsie ileali di individui sani (Fakhry S. *et al.* 2009), sono stati analizzati mediante saggi di attività anti-microbica. Il sopranatante, che per semplicità indicherò come *CFS* (*cell-free supernatant*), proveniente dai singoli ceppi di Lattobacilli, è stato saggiato contro ceppi patogeni di *P. aeruginosa* (AA2, BT72, KK27, MF51, PA14, RP73, TR1) (Bragonzi A. *et al.* 2006; 2009). Tra i vari ceppi di Lattobacilli analizzati (*Lactobacillus mucosae* SF1031, *Lactobacillus mucosae* SF1087, *Lactobacillus mucosae* SF1091, *Lactobacillus mucosae* SF1108, *Lactobacillus gasseri* SF1109, *Lactobacillus mucosae* SF1111, *Lactobacillus mucosae* SF1146, *Lactobacillus gasseri* SF1183, *Lactobacillus mucosae* SF1232, *Lactobacillus mucosae* SF1233) il *CFS* proveniente da *L. gasseri* SF1109 ha mostrato la più forte attività anti-microbica contro i sette ceppi indicatori di *P. aeruginosa*. Poiché molti lavori di letteratura hanno dimostrato che mezzi di coltura e fattori fisici ben controllati sono richiesti per ottenere la maggiore produzione di molecole anti-microbiche (Iyapparaj P. *et al.* 2013; Jimenez-Diaz R. *et al.* 1993), la prima parte del mio lavoro sperimentale ha avuto come obiettivo l'ottimizzazione della produzione di eventuali molecole anti-microbiche

presenti nel *CFS* di *L. gasseri* SF1109, variando pH e temperatura di crescita e scegliendo i valori ottimali per la maggiore resa di molecole anti-microbiche. Inoltre, il *CFS* è stato trattato a varie temperature al fine di capire se fosse termoresistente, poiché vari studi hanno dimostrato che le molecole anti-microbiche prodotte dai batteri acido lattici sono resistenti a forti stress termici (Cotter P. D. *et al.* 2013). Il *CFS* è maggiormente attivo in un determinato intervallo di pH, dimostrando, come riportato in letteratura, la forte correlazione tra pH e attività anti-microbica (Jimenez-Diaz R. *et al.* 1993). Successivamente per avere indicazioni sulla taglia della molecola anti-microbica il *CFS* è stato frazionato utilizzando filtri con *cut-off* di 3kDa. Inoltre, sono stati condotti esperimenti di microscopia a fluorescenza per avere indicazioni sull'interazione del *CFS* con le cellule dei ceppi batterici indicatori. In maniera analoga a quanto realizzato usando come indicatori i ceppi di *P. aeruginosa*, poiché *L. gasseri* SF1109 è un ceppo intestinale, il *CFS* è stato saggiato anche contro ceppi patogeni intestinali, ottenendo risultati analoghi e dimostrando che l'eventuale molecola anti-microbica contenuta nel *CFS* ha un ampio spettro d'azione. Numerosi studi testimoniano che il microbiota intestinale, oltre a produrre un gran numero di molecole anti-microbiche, è in grado di regolare una serie di processi infiammatori

intestinali (Shimazu T. *et al.* 2012). Pertanto, si è deciso di studiare gli effetti del *CFS* di *L. gasseri* SF1109 su una linea di adenocarcinoma del colon (HCT116) in seguito ad induzione pro-infiammatoria con LPS purificato da *E. coli* (Villena J. *et al.* 2014; Lu YC. *et al.* 2008). In tale lavoro di tesi è stata analizzata la risposta delle cellule HCT116, andando a studiare il possibile effetto anti-infiammatorio del *CFS* sui membri della famiglia delle MAPKs (p-ERK 1/2, p-JNK e p-p38). Il passo successivo è stato quello di indagare mediante esperimenti di citometria di flusso sull'effetto del *CFS* sulla proliferazione delle cellule HCT116. In parallelo l'espressione di marcatori del ciclo cellulare, come p21WAF1 e ciclina D1, ha permesso di valutare gli stessi effetti a livello molecolare. Inoltre, sono stati compiuti esperimenti per valutare la tossicità del *CFS* sulla linea cellulare intestinale HCT116. Il *CFS* di *L. gasseri* SF1109 è stato sottoposto ad una caratterizzazione chimica mediante cromatografia di esclusione molecolare, in collaborazione con il gruppo di ricerca del Dott. Alessandro Pezzella (Dipartimento di Chimica, Università Federico II). In modo parallelo le frazioni ottenute dopo cromatografia sono state saggiate per verificarne l'attività anti-microbica, quella anti-infiammatoria ed infine gli effetti sul ciclo cellulare, al fine di capire se la molecola contenuta nel *CFS* possedesse tutte le

attività biologiche descritte. La frazione attiva è stata analizzata mediante spettrometria di massa (AP-MALDI) e Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), queste analisi hanno portato all'identificazione di un piccolo peptide, di circa 1333 Dalton, contenente un residuo di Tirosina ed uno di Fenilalanina, il resto della struttura è in via di elucidazione, probabilmente il resto della sequenza è costituito da aminoacidi modificati (Nakamura H. *et al.* 2015). Una volta compresa l'intera sequenza aminoacidica, sarà possibile ottenere in forma pura il peptide, al fine di validare i risultati ottenuti con il *CFS* sia su cellule batteriche che su cellule eucariotiche e di realizzare studi più dettagliati per comprendere il meccanismo d'azione del peptide attivo.

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

2.1 Ceppi di Lattobacilli

I ceppi di Lattobacilli, isolati dalle biopsie ileali di individui sani, ed utilizzati in questo lavoro sono: *L. mucosae* SF1031, *L. mucosae* SF1087, *L. mucosae* SF1091, *L. mucosae* SF1108, *L. gasseri* SF1109, *L. mucosae* SF1111, *L. mucosae* SF1146, *L. gasseri* SF1183, *L. mucosae* SF1232, *L. mucosae* SF1233 (Fakhry S. *et al.* 2009).

2.2 Crescita batterica e preparazione del *CFS (cell-free supernatant)*

I ceppi di Lattobacilli sono stati coltivati in brodo MRS (Difco, Detroit, MI) per 24h a 37°C e la cultura diluita è stata utilizzata per inoculare terreno minimo MDM (Glucosio 10 g/L, Sodio acetato 5g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, K₂HPO₄ 3 g/L, MgSO₄ * 7H₂O 0.2 g/L, L-Alanina 0.10 g/L, L-Arginina 0.10 g/L, L- acido aspartico 0.20 g/L, L-Cisteina 0.20 g/L, L-

Glutamina 0.20 g/L, L-Istidina 0.10 g/L, L-Isoleucina 0.10 g/L, L-Leucina 0.10 g/L, L-Lisina 0.10 g/L, L- 82 Metionina 0.10 g/L, L-Fenilalanina 0.10 g/L, L-Serina 0.10 g/L, L-Triptofano 0.10 g/L, L-Tirosina 0.10 g/L, L-Valina 0.10 g/L, Acido nicotinico 0.001 g/L, Acido pantotenico 0.001 g/L, Piridoxal 0.002 g/L, Riboflavina 0.001 g/L, Cianocobalamina 0.001 g/L, Adenina 0.01 g/L, Guanina 0.01 g/L, Uracile 0.01 g/L). Cellule dei ceppi di Lattobacilli sono state cresciute anaerobicamente per 48h a 37°C. La coltura è stata centrifugata (3000 rpm per 10 minuti a RT), il CFS di ogni ceppo di Lattobacillo è stato filtrato attraverso un filtro 0,22 um sterile a basso legame proteico (Millex, Millipore, Bedford, MA) e opportunamente concentrato in base alle OD (Optical Density) della crescita batterica.

2.3 Ceppi batterici indicatori

I ceppi batterici indicatori utilizzati in questo lavoro sono stati ceppi di *P. aeruginosa* isolati dall'espettorato o dai tamponi faringei di pazienti affetti da Fibrosi Cistica, indicati con gli acronimi: AA2, BT72, KK27, MF51, RP73 e TR1, e un ceppo di laboratorio di *P. aeruginosa* chiamato PA14 (Bragonzi A. *et al.* 2006; 2009). Inoltre, sono stati utilizzati come indicatori anche i ceppi intestinali: *E. coli* DH5α

ATCC13762, *S. aureus* ATCC 6538P, *S. typhimurium* ATCC14028 e *S. sonnei* ATCC25931.

2.4 Saggio dell'alone d'inibizione.

La produzione di molecole anti-microbiche dai candidati batterici è stata eseguita mediante il saggio dell'alone d'inibizione, seguendo il metodo di Kirby-Bauer (Bauer AW. *et al.* 1966). In particolare si eseguono *spots* da 25µl del CFS (opportunamente concentrato in base alla crescita batterica registrata) da analizzare sul terreno di coltura solido *Muller-Hinton*. Come controllo positivo veniva effettuato, sulla stessa piastra, uno *spot* dell'antibiotico Colistina per i ceppi di *P. aeruginosa* e Ampicillina per *E. coli* DH5α, *S. aureus*, *S. typhimurium* e *S. sonnei*. Successivamente, sulla superficie di agar su cui è stato posto il CFS da saggiare, veniva effettuata la semina, in TBS o TY agar allo 0,8%, del ceppo batterico indicatore. Le piastre così prodotte erano incubate a 37 °C *o.n.* ed il giorno seguente si valutava l'attività anti-microbica espressa in Unità arbitraria/ml (AU/ml), così calcolata (Iyapparaj P. *et al.* 2013):

$$\text{AU/ml} = \frac{\text{Diameter of the zone of clearance (mm)} \times 1000}{\text{Volume taken in the well (}\mu\text{l)}}$$

2.5 Ottimizzazione delle condizioni di coltura.

L'influenza della temperatura sulla produzione di molecole anti-microbiche è stata esaminata. *L. gasseri* SF1109, cresciuto in terreno MRS per 24h a 37°C, veniva utilizzato per inoculare terreno minimo MDM per 48h a differenti temperature: 30°C, 37°C, 42°C e 45°C. In maniera simile, il terreno veniva portato a diversi valori di pH: 4.0, 6.0, 8.0, 10.0. Il *CFS* proveniente da ciascun tipo di terreno veniva esaminato per la produzione di molecole anti-microbiche contro i ceppi indicatori, dopo essere stato opportunamente concentrato sulla base delle crescita batterica registrata.

2.6 Sensibilità del *CFS* a pH e temperatura.

Per determinare gli effetti di varie temperature sull'attività del *CFS*, *L. gasseri* SF1109 veniva cresciuto in terreno MRS per 24h a 37°C e la cultura diluita è stata utilizzata per inoculare terreno minimo MDM per 48h pH 6.0 a 37°C. Poi, il *CFS*, ottenuto mediante centrifugazione e filtrazione veniva concentrato ed incubato a varie temperature (50°C, 75°C, 100 e 120°C) per 30'. L'attività anti-microbica del *CFS* trattato a

varie temperature e del controllo non trattato (25°C) venivano determinate mediante il metodo di diffusione in agar molle. L'effetto del pH sull'attività del *CFS* è stato determinato mediante variazione del pH di tale *CFS*, ottenuto dopo crescita in MDM per 48h a 37°C. Quindi, l'attività antimicrobica veniva misurata mediante il metodo di diffusione in agar molle.

2.7 Determinazione del peso molecolare mediante frazionamento

L. gasseri SF1109 è stato cresciuto in terreno MRS per 24h a 37°C e la cultura diluita veniva utilizzata per inoculare terreno minimo MDM per 48h pH 6.0 a 37°C. Il *CFS*, ottenuto mediante centrifugazione e filtrazione, è stato frazionato mediante filtri con *cut-off* di 3kDa (Centricon, Millipore). Il *CFS* totale e le frazioni ottenute venivano esaminate contro differenti patogeni mediante il metodo di diffusione in agar molle.

2.8 Saggi di attività anti-microbica.

Una colonia singola dei diversi ceppi batterici è stata risospesa in 5 ml di terreno *TBS* o *TY* (a seconda del ceppo batterico utilizzato), tale coltura è stata incubata a 37°C e a 150 r.p.m. di agitazione *o.n.* Una volta giunta a 1 O.D, la coltura batterica è stata diluita di 1000 volte in *PBS* 0,0067 M a pH 7.4. Sono stati preparati campioni dal volume finale di 500µl contenenti cellule batteriche per 1/25 del volume finale, e si aggiungeva il *CFS* a diverse concentrazioni e *PBS* a pH 7.4 fino a volume. Il controllo negativo era rappresentato da cellule incubate in assenza di *CFS*. I campioni venivano incubati alla temperatura di 37°C, in agitazione a 150 r.p.m per 4h. Successivamente si preparavano diluizioni seriali (1:100, 1:1000) di tutti i campioni e si piastravano su terreno solido *TSA* o *TY* agar a seconda del ceppo batterico utilizzato nel saggio; le capsule Petri venivano infine incubate alla temperatura di 37°C *o.n.* Il giorno seguente si effettuava una stima della percentuale di cellule sopravvissute, contando su ciascuna piastra il numero di CFU presenti e rapportandole ai controlli. Ciascun esperimento era condotto in triplicato ed il risultato finale era una media dei tre esperimenti indipendenti.

2.9 Determinazione della Minima Concentrazione Inibente la Crescita (MIC).

La Minima Concentrazione Inibente la crescita (MIC) è stata determinata con il metodo delle micro-diluizioni approvato dal *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. 95µl di *CAM-HB* contenente il *CFS* a varie concentrazioni è stato aggiunto ad ogni pozzetto di una *96-well microtiter plate*. 5µl di coltura batterica *o.n.* venivano aggiunti ad ogni pozzetto per ottenere una concentrazione finale di circa 5×10^5 cell/ml. I pozzetti contenenti il solo terreno *CAM-HB* e 5µl di coltura batterica *o.n.* rappresentavano il controllo dell'esperimento. La MIC veniva determinata dopo 16-20h di incubazione a 37 °C. (*National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nint informational supplement. NCCLS document M100-S9 [ISBN1-56238-358-2]. NCCLS, 940 West Valley Road, Wayne, Pa19087-1898 USA, 1999*).

2.10 Colorazione con DAPI/IP.

Un volume di 2 ml di cellule veniva trattato con 1 ml di soluzione A (2.1 g di acido citrico/0.5 g di Tween 20 in 100

ml di H₂O bi-distillata) per 10', lavato e risospeso in 2 ml di soluzione B (0.24 μ M 4',6-diamidino-2'-fenilindolo, DAPI-SIGMA, 400 mM Na₂HPO₄, pH 7.0) per almeno 20' al buio a temperatura ambiente. Per determinare l'integrità della membrana, le cellule vive venivano lavate e risospese in 2ml di PBS (concentrazione cellulare di 3×10^8 cell/ml) e colorate con 20 μ l di Ioduro Propidio, 3,8-diammino-5dietilmetilamminopropil-6fenilfenantridin diioduro, PI-Sigma-Aldrich (concentrazione finale: 1 μ M, stock solution: 0.07 mg/ml, in PBS, pH 7.2) per 10' (Shi L. *et al.* 2006). Tale esperimento è stato condotto in parallelo per le cellule di controllo e le cellule trattate con *CFS* opportunamente concentrato.

2.11 Acquisizione immagini mediante microscopia a fluorescenza.

Sei microlitri di ciascun campione sono stati posti su vetrini per microscopio e coperti con vetrini precedentemente trattati per 30'' con poli-L-lisina (Sigma). I campioni sono stati osservati con un microscopio a fluorescenza Olympus BX51 utilizzando un filtro blu DAPI (U-M536 filtri di eccitazione tra 330-385. Il tempo di acquisizione utilizzato è stato di 100 ms per il DAPI/IP e le immagini sono state acquisite ed

elaborate utilizzando una fotocamera digitale Olympus DP70 (Manzo N. *et al.* 2013; Williams S.C. *et al.* 1998).

2.12 Colture cellulari e trattamento con *CFS* batterico.

Le cellule HCT116 (ATCC CCL 247) derivate da un adenocarcinoma del colon scarsamente differenziato sono state coltivate in RPMI 1640 integrato con 10% siero fetale bovino e 1% di penicillina-streptomicina. Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Il *CFS* batterico era impiegato per il trattamento alla concentrazione del 5% v/v nel terreno di coltura completo. Dopo incubazione di 16h con *CFS* (5% v/v), LPS 5µg/ml (Sigma) è stato aggiunto (quando necessario) e le cellule venivano raccolte dopo 1h di trattamento. Le cellule venivano lisate e gli estratti cellulari analizzati per *Western blot* e FACS, come descritto di seguito.

2.13 Analisi di *SDS-PAGE* e *Western blot*.

Le cellule sono state raccolte in tampone di lisi (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1

mM fenilmetilsulfonil fluoruro, sodio desossicolato 0,5%, e inibitori di proteasi) (Vivo M. *et al.* 2009). I lisati cellulari sono stati incubati in ghiaccio per 40', e gli estratti sono stati centrifugati a 13.200 rpm per 15' per rimuovere i detriti cellulari. La concentrazioni proteica è stata determinata tramite l'utilizzo del *Bio-Rad protein assay* (Bio-Rad). Dopo l'aggiunta di 2x Laemmli buffer (SIGMA), i campioni sono stati bolliti a 100°C per 5' e risolti tramite gel di SDS-poliacrilammide (10% o 12%). Le proteine sono state trasferite su una membrana di polyvinylidenedifluoride (PVDF) (membrane Millipore) (Vivo M. *et al.* 2013). Le membrane sono state trattate con buffer di latte al 5% w/v (5% w/v non grasso liofilizzato, 50 mM Tris, 200 mM NaCl, 0,2% Tween 20) e incubate con anticorpi primari diluiti in 5% w/v latte o albumina serica bovina, per 2h a temperatura ambiente o per una notte a 4°C. Gli anticorpi primari utilizzati erano: anti-rabbit p-ERK 1/2 (Cell Signaling), anti-rabbit p-JNK (Santa-Cruz Biotechnology), anti-rabbit p-p38 (Santa-Cruz Biotechnology), anti-rabbit ciclina D1(Santa-Cruz Biotechnology), anti-rabbit p21 (Santa-Cruz Biotechnology), anti-goat β -actina (Santa-Cruz Biotechnology). I dati sono stati visualizzati mediante metodo di chemiluminescenza (ECL, GE- Healthcare) usando anticorpi secondari coniugati con HRP (Santa-Cruz

Biotechnology) incubati 1h a temperatura ambiente, e analizzati mediante software Quantity One ® ChemiDoc TMXRS del sistema (Bio-Rad).

2.14 Colorazione del gel di poliacrilammide con Blu di Comassie.

Il gel di poliacrilammide ottenuto veniva fissato e colorato con una soluzione colorante formata da 625 mM *Comassie Brilliant Blue*, metanolo al 25% e acido acetico al 10% , per circa 40'. Dopo tale trattamento il gel appariva colorato uniformemente di viola. Il legame che si formava tra il composto colorante e le proteine era stabile ed irreversibile e quindi per rimuovere il colorante in eccesso il gel veniva decolorato con una soluzione costituita da metanolo al 25% e acido acetico al 10% , e seccato a 80°C sotto vuoto per 2h.

2.15 Crescita cellulare e analisi di citometria di flusso.

Le HCT116 sono state piastrate in capsule da 35 mm con una densità cellulare pari a $2,5 \times 10^5$ cellule/piastra. Per l'analisi della crescita cellulare, le cellule sono state coltivate in mezzo di crescita completo implementato o no con *CFS*

batterico al 5% v/v per 16 ore. Dopo il trattamento, le cellule sono state raccolte e contate in una camera di Burker. Per l'analisi di citometria di flusso le cellule sono state lavate due volte con PBS e raccolte con tripsina 0,05% in 0,15% Na₂EDTA. Le cellule sono state quindi centrifugate, lavate in PBS, fissate con etanolo ghiacciato 70%, e conservate per una notte a 4°C. Le cellule fissate erano poi lavate in PBS e incubate con ioduro di propidio (50 µg/ml) e RNasi A (10 µg/ml) per 30' a temperatura ambiente. L'acquisizione dei dati è stata effettuata utilizzando un CyAn ADP Citofluorimetro (Beckman Coulter, Inc., Milano, Italia) e il software ad esso collegato (Di Iuccia B. *et al.* 2013).

2.16 Saggio MTS.

Cellule HCT116 sono state coltivate ad una densità di 2,5 x10⁵ cellule per pozzetto a fondo piatto in piastre da 6 pozzetti e implementate o non con CFS (5% v/v) per 24 ore. Dopo il trattamento, CellTiter 96 ® ACQUOSA One Solution Reagent (Promega, Madison, WI) è stata aggiunta a ciascun pozzetto secondo le istruzioni del produttore. Dopo 30 minuti in coltura la vitalità cellulare è stata determinata misurando l'assorbanza a 490 nm usando uno spettro Multiskan (Thermo Electron Corporation).

2.17 Cromatografia di esclusione molecolare, spettrometria di massa (MALDI) e Risonanza Magnetica Nucleare (NMR).

La cromatografia di esclusione molecolare è stata effettuata usando una colonna Superdex Peptide 10/300 GL (GE *Lifescience*) equilibrata con una soluzione di carbonato di ammonio 5mM (pH 7.8). La velocità di flusso adottata è stata di 0.5 ml/min. Gli spettri NMR sono stati registrati mediante spettrofotometri Varian Gemini 200 MHz e Bruker DRX-400 MHz. Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR sono stati registrati in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, DMSO- d_6 e piridina- d_5 ; i valori delle costanti di accoppiamento J erano riportati in Hz. Gli esperimenti bidimensionali ^1H , ^1H COSY, ^1H , ^{13}C HSQC, ^1H , ^{13}C HMBC e ROESY sono stati condotti a 400.1 MHz utilizzando programmi di impulsi standard. Gli spettri di massa Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (AP-MALDI) sono stati registrati con uno strumento Agilent 1100 Series fornito di una trappola ionica MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) (Zvanych R. *et al.* 2014; Fekete S. *et al.* 2014).

Capitolo 3

RISULTATI

3.1 *Screening* di Lattobacilli.

Il punto di partenza del mio progetto di dottorato consisteva nell'analizzare un pannello di ceppi di Lattobacilli, disponibili nel laboratorio di microbiologia presso cui ho svolto l'attività di tesi, al fine di scegliere il ceppo che avesse la maggiore attività anti-microbica contro 6 ceppi di *P. aeruginosa* (AA2, BT72, KK27, MF51, RP73 e TR1) isolati dall'espettorato o dai tamponi faringei di pazienti affetti da Fibrosi Cistica e contro un ceppo di laboratorio di *P. aeruginosa* (PA14). I ceppi di Lattobacilli isolati da biopsie ileali di individui sani erano: *L. mucosae* SF1031, *L. mucosae* SF1087, *L. mucosae* SF1091, *L. mucosae* 1108, *L. gasseri* SF1109, *L. mucosae* SF1111, *L. mucosae* SF1146, *L. gasseri* SF1183, *L. mucosae* SF1232, *L. mucosae* SF1233. Tali ceppi sono stati cresciuti per 48h in terreno minimo (MDM) a 37°C, veniva letta la densità ottica a 600 nm e tale densità è stata utilizzata per normalizzare la quantità di *CFS* (*Cell Free Supernatant*) utilizzata. Il saggio

di attività anti-microbica consisteva nel metodo di diffusione in agar molle. L'attività anti-microbica relativa al *CFS* di ogni ceppo è stata espressa in Unità Arbitraria/ml (AU/ml), ossia come il rapporto tra il diametro dell'alone d'inibizione e il volume di *CFS* utilizzato, i valori riportati in ogni grafico erano il risultato della media di sei replicati. Le figure 6A e 6B mostrano gli aloni di inibizione dei *CFS* provenienti dai singoli ceppi di Lattobacilli contro il ceppo indicatore di *P. aeruginosa*, AA2, il controllo dell'esperimento era rappresentato dalla colistina, la quale fa parte della famiglia delle polimixine, antibiotici comunemente utilizzati per il trattamento di patogeni opportunisti come *P. aeruginosa* (Chen H. *et al.* 2014). Il *CFS* dei ceppi *L. mucosae* SF1031 e SF1091 mostrava la minore attività anti-microbica (400 AU/ml), mentre il *CFS* del ceppo *L. gasseri* SF1109 possedeva la maggiore attività anti-microbica (800 AU/ml) (figura 6C). Risultati analoghi a quelli riportati in grafico per il ceppo AA2 sono stati ottenuti anche per gli altri ceppi indicatori di *P. aeruginosa* utilizzati. Il *CFS* di *L. gasseri* SF1109 era il miglior candidato per la produzione di molecole anti-microbiche contro tutti i sette ceppi indicatori, pertanto abbiamo deciso di concentrare i nostri studi su tale ceppo.

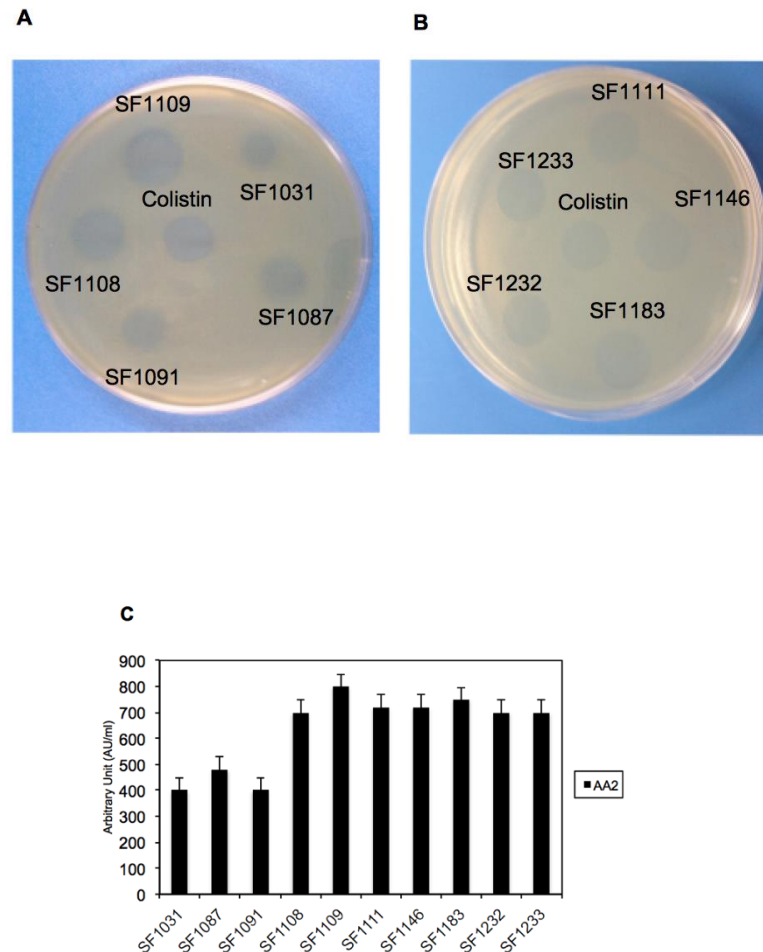


Figura 6 Attività anti-microbica del CFS proveniente dai ceppi di Lattobacilli contro il ceppo AA2 di *P. aeruginosa*. A) e B) Saggio dell'alone d'inibizione. C) Grafico a barre, sull'asse delle ordinate sono riportate le Unità arbitrarie/ml (AU/ml) e sull'asse delle ascisse è riportato il CFS di ogni ceppo di Lattobacillo utilizzato. Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per sei repliche.

3.2 Ottimizzazione delle condizioni di coltura del ceppo *L. gasseri* SF1109.

Numerosi studi hanno dimostrato che la produzione di molecole anti-microbiche da parte dei batteri lattici potrebbe essere fortemente influenzata da fattori quali pH e

temperatura (De Vuyst L. *et al.* 1992; Leroy F. *et al.* 1999), poichè la variazione di questi due parametri potrebbe portare ad un incremento o ad un decremento della produzione della molecola contenuta nel *CFS*. Al fine di valutare l'influenza del pH, il ceppo *L. gasseri* SF1109 veniva cresciuto in terreno minimo per 48h a differenti pH: 4.0, 6.0, 8.0 e 10.0. La figura 7A mostra gli aloni d'inibizione del *CFS* di *L. gasseri* SF1109, cresciuto a pH 4.0, 6.0 e 8.0, contro il ceppo indicatore AA2 di *P. aeruginosa*, a pH 10.0 *L. gasseri* SF1109 non presenta alcuna capacità di crescere. La maggiore produzione di molecole anti-microbiche contro i sette ceppi indicatori di *P. aeruginosa* utilizzati si otteneva dopo crescita a pH 6.0, come si può osservare nella figura 7B, con un valore massimo di 710 AU/ml contro i ceppi RP73 e TR1; dopo crescita di *L. gasseri* SF1109 sia a pH 4.0 che a pH 8.0 si osservava un decremento dell'attività anti-microbica. In seguito alla valutazione dell'influenza del pH sulla produzione di molecole anti-microbiche da parte del *CFS* di *L. gasseri* SF1109, è stata variata la temperatura di incubazione di tale batterio (30, 37, 42 e 45°C), al fine di stabilire quale fosse quella ottimale per la maggiore produzione di molecole anti-microbiche. Come è possibile osservare nelle figure 8A e 8B la maggiore produzione di molecole anti-microbiche contro i ceppi indicatori utilizzati si

otteneva dopo crescita di *L. gasseri* SF1109 a 37°C, con un valore massimo di produzione di 730 AU/ml contro il ceppo TR1, mentre alla temperatura massima di 45°C si aveva un decremento molto marcato della produzione di molecole anti-microbiche. Da questi esperimenti si poteva evincere che le condizioni migliori di crescita di *L. gasseri* SF1109 per ottenere la maggiore produzione di molecole anti-microbiche sono pH 6.0 e temperatura d'incubazione di 37°C .

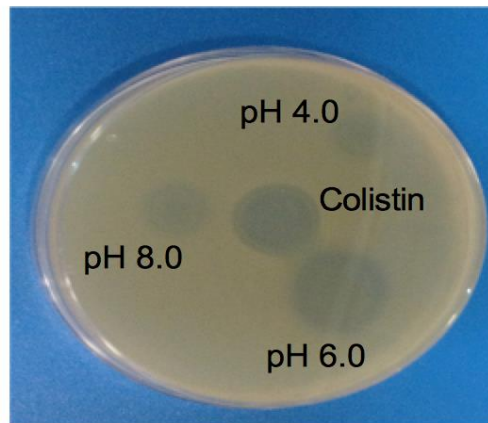
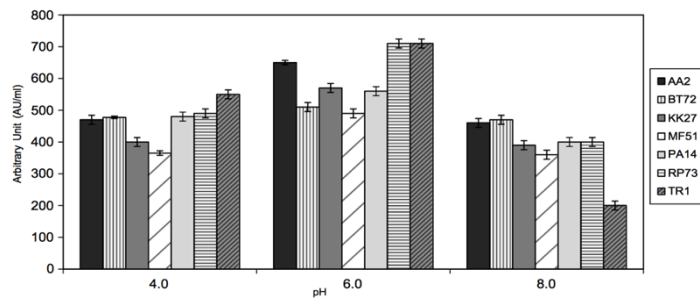
A**B**

Figura 7 Attività anti-microbica del CFS di *L. gasseri* SF1109 cresciuto a differenti pH. A) Aloni d'inibizione contro il ceppo AA2 di *P. aeruginosa*. B) Attività antimicrobica contro i sette ceppi indicatori di *P. aeruginosa* utilizzati, il CFS di *L. gasseri* è stato ottenuto da colture a differenti pH. Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per sei repliche.

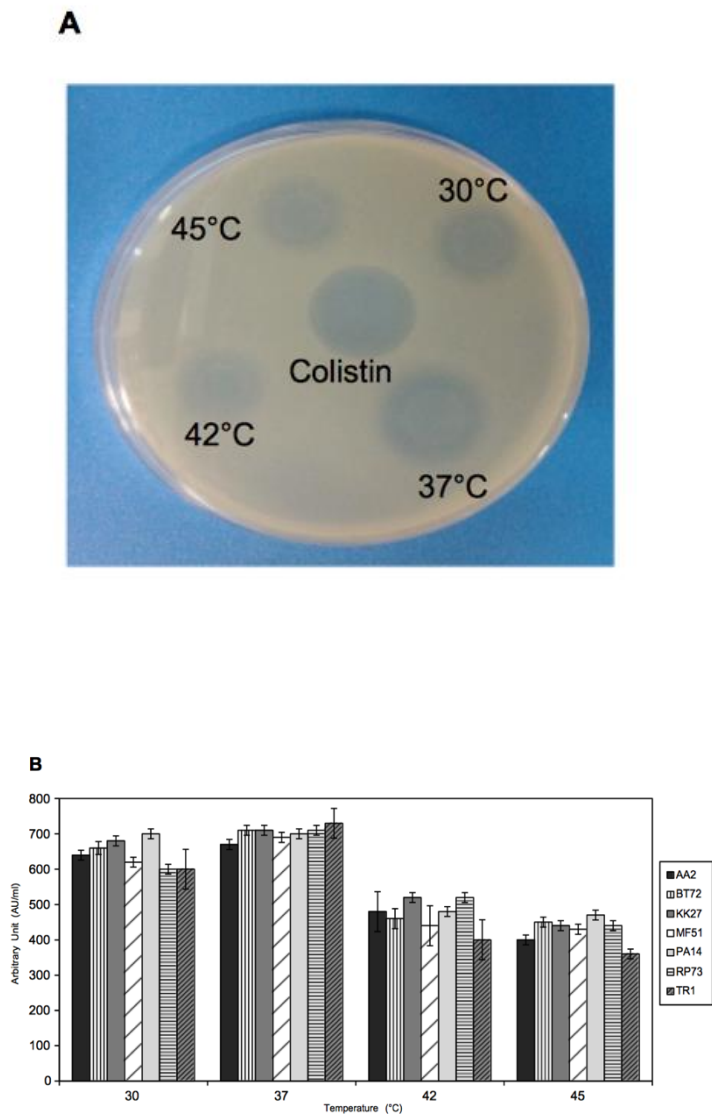


Figura 8 Attività anti-microbica del CFS di *L. gasseri* SF1109 cresciuto a differenti temperature. A) Aloni d'inibizione contro il ceppo AA2 di *P. aeruginosa*. B) Attività antimicrobica contro i sette ceppi indicatori di *P. aeruginosa* utilizzati, il CFS di *L. gasseri* è stato ottenuto da colture a differenti temperature. Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per sei repliche.

3.3 Effetti di variazioni di pH e temperatura sull'attività anti-microbica del CFS di *L. gasseri* SF1109.

Dopo aver delineato le migliori condizioni di pH e temperatura di crescita del ceppo *L. gasseri* SF1109 per la migliore produzione di molecole anti-microbiche, è stata posta attenzione sugli effetti di pH e temperatura sull'attività anti-microbica del CFS. Come era noto dalla letteratura, le molecole anti-microbiche prodotte dai batteri lattici erano attive in un determinato intervallo di pH (Perez R.H. *et al.* 2014). Ad esempio, incrementando i livelli di pH si aveva una riduzione dell'attività dell'acidocina LCHV di *L. acidophilus* (Mkrtchyan H. *et al.* 2010), mentre la pediocina AcH di *Pediococcus acidilactici* mostrava attività anti-microbica a un pH di 3.6-3.7 (Biswas SR. *et al.* 1991). Il CFS di *L. gasseri* SF1109, ottenuto dopo crescita a 37°C per 48h, aveva un pH compreso tra 3.5 e 4.0, se il CFS era portato verso valori di pH più acidi di 3.5, a causa di un incremento dell'acidità del terreno si aveva un aumento molto marcato dell'attività anti-microbica, infatti vi era la presenza di aloni d'inibizione molto marcati anche nel terreno di coltura a pH inferiori a 3.5. La figura 9A mostra gli aloni d'inibizione contro il ceppo AA2 di *P. aeruginosa* a diversi pH, la figura 9B, mostra invece il grafico di attività anti-microbica in

funzione degli aloni d'inibizione contro i sette ceppi indicatori utilizzati. Quando il *CFS* veniva portato verso valori basici di pH (da pH 4.0 a pH 10.0) non si osservava più formazione dell'alone d'inibizione, quindi il *CFS* di *L. gasseri* SF1109 è maggiormente attivo a valori di pH compresi tra 3.5 e 4.0, poichè in questo *range* di pH il terreno di crescita, usato come controllo, non aveva attività anti-microbica, dimostrando che tale attività era legata a molecole secrete e non dipendeva dall'acidificazione del terreno.

Dopo aver valutato gli effetti del pH sull'attività anti-microbica del *CFS*, mi è sembrato opportuno trattare il *CFS* a varie temperature, al fine di avere informazioni sulla natura chimica dell'eventuale molecola e capire se riuscisse a conservare l'attività anti-microbica anche dopo riscaldamento ad alte temperature, resistendo agli stress termici. Dopo crescita di *L. gasseri* SF1109 per 48h a 37°C il *CFS* opportunamente concentrato è stato riscaldato per 30' a 50, 75, 100 e 120°C, paragonandolo al controllo non riscaldato (*CFS* a 25°C). Il *CFS* resisteva a forti stress termici, come si osservava in figura 10A in cui l'alone d'inibizione contro il ceppo AA2 è evidente anche dopo riscaldamento a 120°C e in figura 10B in cui il *CFS* riscaldato alle varie temperature è stato saggiato contro i sette ceppi di *P. aeruginosa* utilizzati, dimostrando che non si aveva nessuna perdita di attività anti-

microbica (espressa in AU/ml), se comparata a quella del controllo non trattato alle differenti temperature.

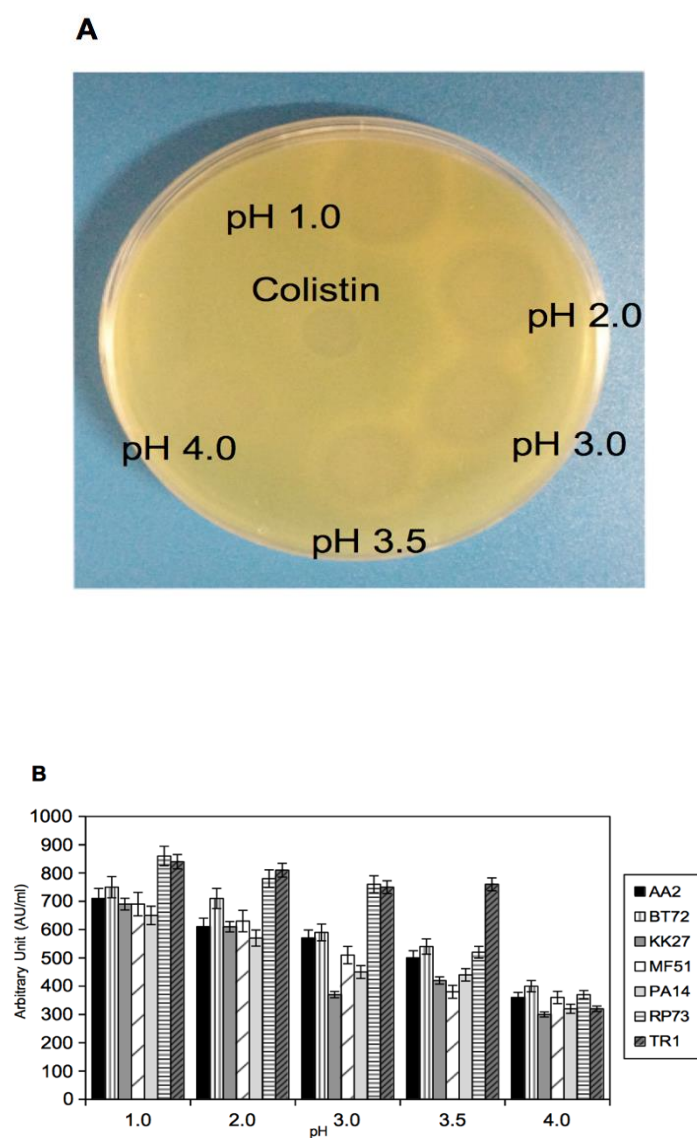


Figura 9 Attività anti-microbica del CFS a differenti pH. A) Aloni d'inibizione contro il ceppo AA2 di *P. aeruginosa*. B) Saggio di attività antimicrobica contro i sette ceppi indicatori di *P. aeruginosa* utilizzati, sull'asse delle ordinate è espressa l'attività in Unità arbitraria/ml (AU/ml), sull'asse delle ascisse sono riportati i CFS trattati a differenti pH. Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per sei repliche.

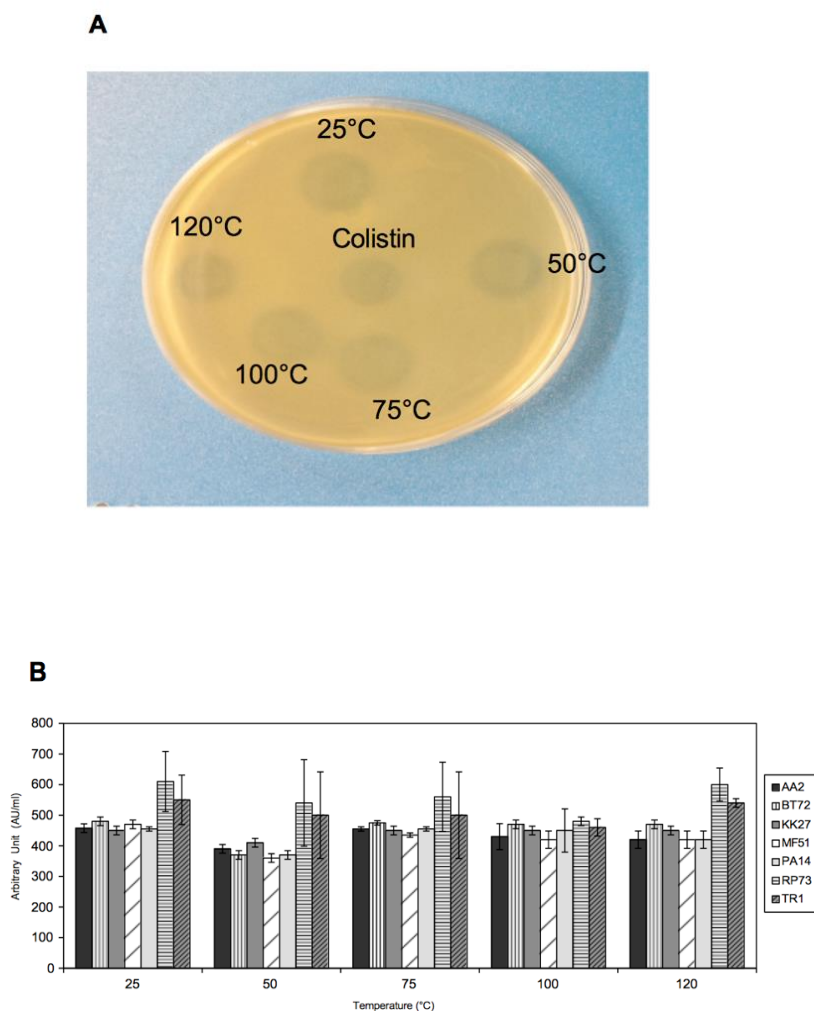


Figura 10 Attività anti-microbica del CFS a differenti temperature. A) Aloni d'inibizione contro il ceppo AA2 di *P. aeruginosa*. B) Saggio di attività antimicrobica contro i sette ceppi indicatori di *P. aeruginosa* utilizzati, sull'asse delle ordinate è espressa l'attività in Unità arbitraria/ml (AU/ml), sull'asse delle ascisse sono riportati i CFS trattati a differenti temperature. Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per sei repliche.

3.4 Effetti dell'attività anti-microbica del *CFS* dopo frazionamento.

Dopo aver ottimizzato la produzione di molecole anti-microbiche e aver valutato gli effetti di pH e temperatura, sulla bio-attività del *CFS*, mi è sembrato importante avviare una caratterizzazione della molecola secreta da *L. gasseri* SF1109. Le molecole anti-microbiche secrete dal sopranatante dei batteri acido lattici frequentemente sono molecole di piccole dimensioni; ad esempio, le batteriocine dei *Gram* positivi sono <10kDa, oppure si conoscono piccoli peptidi secreti dal sopranatante di ceppi di Lattobacilli di circa 1kDa (Lu R. *et al.* 2009). Una prima indicazione è stata ottenuta frazionando il *CFS* mediante filtri con *cut-off* di 3kDa e saggiando il *CFS* totale (utilizzato come controllo), la frazione <3kDa e la frazione >3kDa contro i ceppi indicatori di *P. aeruginosa* utilizzati. La formazione dell'alone contro il ceppo AA2 si osservava chiaramente solo per la frazione <3kDa (figure 11A e 11B) e per il controllo (*CFS* totale), mentre era assente nella frazione >3kDa. Tali esperimenti, condotti contro i sette ceppi di *P. aeruginosa* oggetto del nostro studio, dimostravano che l'eventuale molecola ad

attività anti-microbica contenuta nel *CFS* di *L. gasseri* SF1109 avesse una massa minore o uguale a 3kDa.

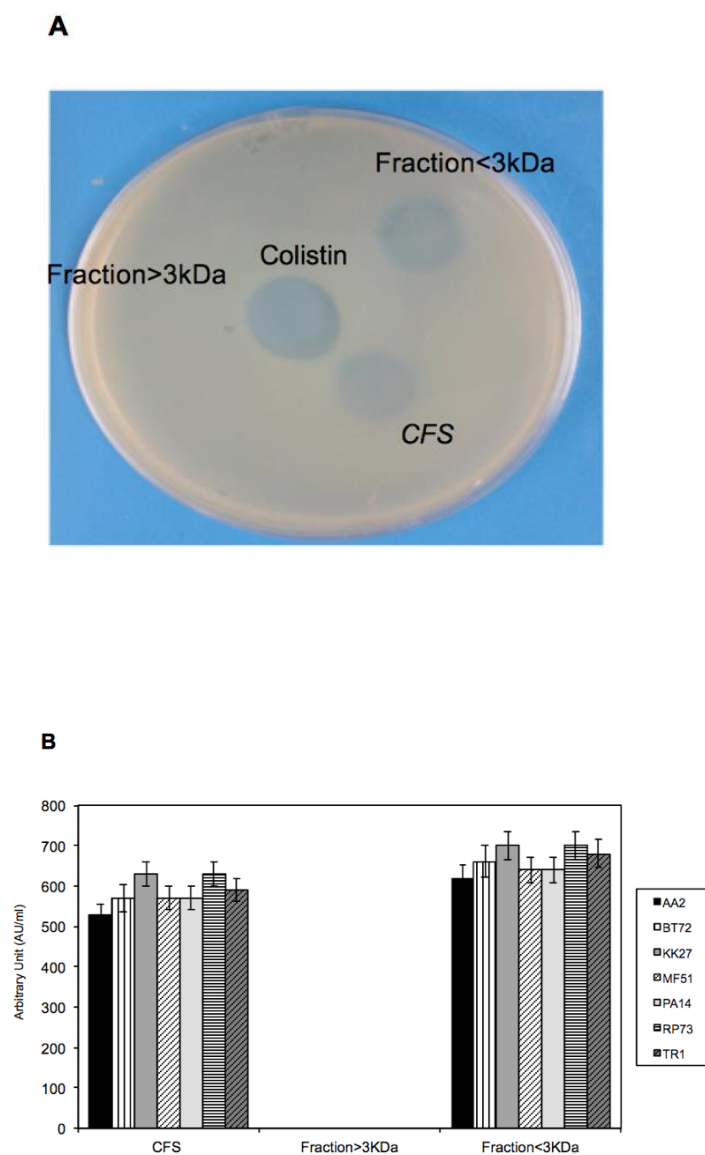


Figura 11 Attività anti-microbica del *CFS* totale, della frazione <3kDa e della frazione >3kDa. A) Aloni d'inibizione contro il ceppo AA2 di *P. aeruginosa*. B) Attività antimicrobica contro i sette ceppi indicatori di *P. aeruginosa* utilizzati, sull'asse delle ordinate è espressa l'Unità arbitraria/ml (AU/ml); sull'asse delle ascisse sono riportati il *CFS* totale, la frazione <3kDa e la frazione >3kDa. Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per sei repliche.

3.5 Attività anti-microbica e determinazione della MIC.

Allo scopo di conoscere la velocità con cui il *CFS* esplica la propria azione anti-microbica sulle cellule dei ceppi indicatori di *P. aeruginosa* utilizzati, è stato realizzato un *time-course*, incubando le cellule dei sette ceppi indicatori per 5', 30', 60', 120' e 240' con *CFS* opportunamente concentrato. Come si può osservare in figura 12, già dopo 5' di incubazione si aveva il 50% di mortalità del ceppo AA2, mentre dopo 30' si raggiungeva il 99% di mortalità, dimostrando che il *CFS* esplica la propria azione anti-microbica in maniera piuttosto rapida. Il terreno di crescita (MDM), utilizzato allo stesso valore di pH del *CFS* ed alla stessa concentrazione non mostrava attività anti-microbica, dimostrando ancora una volta che l'attività del *CFS* è legata a molecole secrete e non dipende dall'acidificazione del terreno. A tal punto ho verificato se tale *CFS* avesse un effetto batteriostatico, in grado di inibire o limitare la replicazione batterica senza uccidere le cellule di *P. aeruginosa* utilizzate, o battericida, in grado di causare la morte delle cellule dei ceppi indicatori utilizzati. Quando le

cellule di *P. aeruginosa*, incubate per 30, 60, 120 o 240' con il *CFS*, venivano re-inoculate in un terreno di coltura fresco ed incubate a 37°C o.n., non riuscivano a crescere, dimostrando che il *CFS* possiede un potente effetto battericida, già dopo 30' di incubazione.

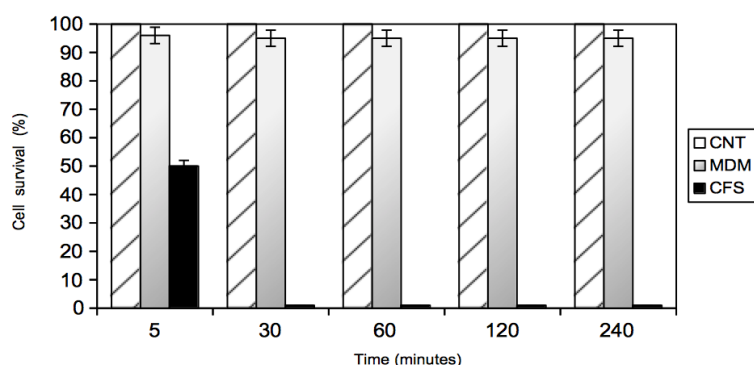


Figura 12 Saggio di attività anti-microbica del *CFS* contro il ceppo AA2 di *P. aeruginosa* a vari tempi.

Sull'asse delle ordinate è riportata la % di sopravvivenza cellulare e sull'asse delle ascisse i tempi d'incubazione delle cellule del ceppo AA2 con il *CFS*. Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per sei repliche.

Per determinare quale fosse la minima concentrazione di *CFS* inibente la crescita delle cellule di *P. aeruginosa*, il *CFS* di *L. gasseri* SF1109 è stato utilizzato a differenti quantità arbitrarie: 5, 10, 20, 40 e 80µl e concentrato 50X sulla base della densità ottica del ceppo *L. gasseri* SF1109 registrata dopo 48h di crescita. Dagli esperimenti condotti è emerso che la più bassa concentrazione inibente la crescita di tutti i ceppi di *P. aeruginosa* utilizzati era di 10µl, mentre il terreno di crescita (MDM), utilizzato allo stesso valore di pH e alla

stessa concentrazione, era privo di attività anti-microbica (figura 13).

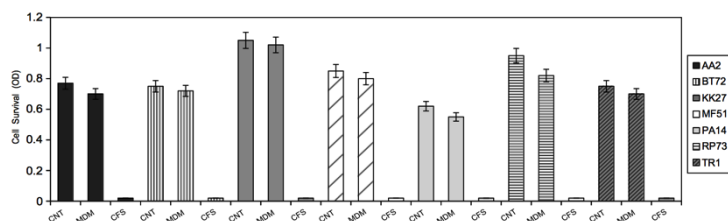


Figura 13 Determinazione della MIC (Minima Concentrazione Inibente la crescita) del CFS contro i sette ceppi di *P. aeruginosa*. Sull'asse delle ordinate è riportata la sopravvivenza cellulare, espressa in OD (Optical Density), e sull'asse delle ascisse: il controllo (CNT, solo cellule), il terreno MDM e il CFS. Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per sei repliche.

3.6 Studi di interazione delle cellule di *P.aeruginosa* con il CFS.

Sulla base di tutti i risultati ottenuti, tenendo in considerazione soprattutto la rapida azione anti-microbica esplicata dal CFS, nonché il suo effetto battericida, sembrava piuttosto interessante indagare in che modo il CFS potesse interagire con le cellule dei ceppi indicatori utilizzati ed esplicare la propria azione. Sono stati condotti esperimenti di microscopia a fluorescenza utilizzando due coloranti: il DAPI e il PI. Il DAPI è un colorante fluorescente in grado di oltrepassare la membrana plasmatica e colorare sia le cellule vive che quelle morte. Questo colorante viene eccitato dalla

luce ultravioletta e forma complessi fluorescenti con il DNA a doppia elica, mostrando una specificità per le basi A-T. Quando il DAPI si lega al DNA, il suo assorbimento massimo è a 358 nm, la sua emissione massima a 461 nm ed emette una fluorescenza nel blu. Il PI è un colorante caratterizzato da una bassa fluorescenza (rosso-arancio), è un agente intercalante che si lega al DNA con poca o nessuna preferenza per coppie di basi, non permea attraverso le membrane e di solito viene escluso dalle cellule vive; il suo assorbimento massimo è a 550 nm e la sua emissione massima a 590 nm. Il metodo del DAPI/IP veniva condotto in parallelo per le cellule di controllo del ceppo AA2 di *P. aeruginosa* e per le cellule di tale ceppo trattate per 30' con *CFS* opportunamente concentrato. La figura 14A mostra le cellule del ceppo AA2 (controllo) che emettevano la fluorescenza blu del DAPI, mentre il PI non era in grado di colorare le cellule di controllo poiché esse avevano la membrana integra. Quando le cellule del suddetto ceppo venivano trattate per 30' con *CFS*, si osservava un incremento di fluorescenza rossa (figura 14B). Il *CFS* aveva esplicato la propria azione battericida a livello della membrana plasmatica che perde la propria integrità, consentendo al PI di intercalarsi nel DNA e di colorare le cellule del ceppo AA2. Tali esperimenti sono stati condotti

contro tutti e sette i ceppi indicatori di *P. aeruginosa* utilizzati e dimostrano che il *CFS* del ceppo *L. gasseri* SF1109 probabilmente esplica la propria azione a livello della membrana esterna dei batteri *Gram* negativi utilizzati in tali esperimenti.

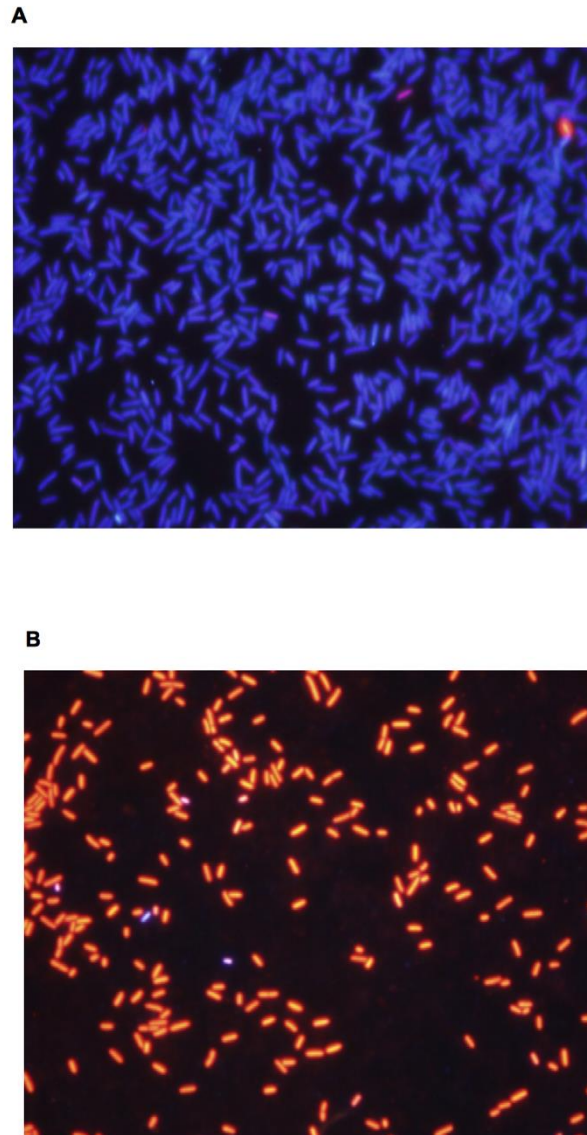
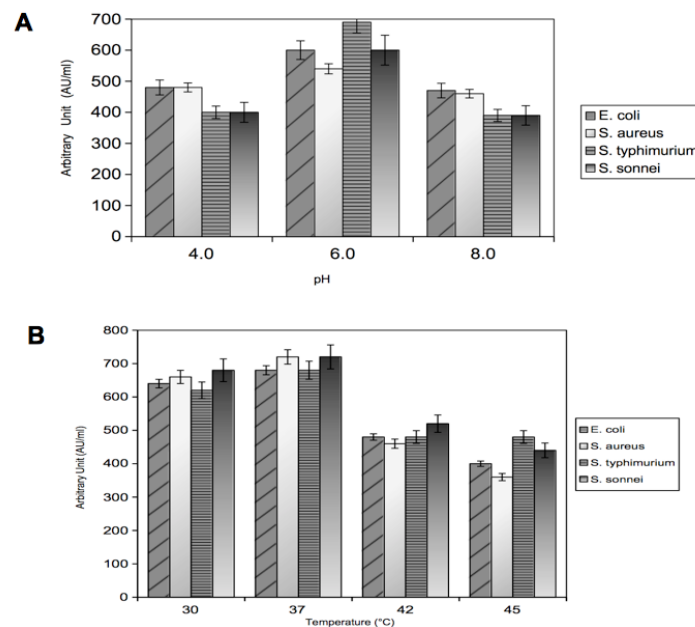


Figura 14 Microscopia a fluorescenza mediante colorazione con DAPI/IP. A) Controllo del ceppo AA2 di *P. aeruginosa*. B) Cellule del ceppo AA2 trattate con *CFS* per 30'.

3.7 Studio dell'attività anti-microbica del *CFS* su ceppi intestinali: *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* e *S. sonnei*.

Poiché *L. gasseri* SF1109 è un ceppo isolato da biopsie intestinali, mi è sembrato interessante studiare l'effetto del *CFS* anche su ceppi di provenienza intestinale, in particolare ho utilizzato come indicatori: *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* e *S. sonnei*. In primo luogo sono state ottimizzate le condizioni di coltura, variando il pH e la temperatura di crescita del ceppo *L. gasseri* SF1109. In maniera analoga a quanto ottenuto utilizzando come indicatori i ceppi di *P. aeruginosa* è risultato che la maggiore produzione di molecole anti-microbiche contro i ceppi intestinali, si otteneva dopo crescita a pH 6.0 e con una temperatura di incubazione di 37°C (figure 15A e B); in secondo luogo è stata posta l'attenzione sugli effetti di pH e temperatura sull'attività anti-microbica del *CFS*, confermando i risultati precedentemente descritti: esso era attivo ad un valore di pH compreso tra 3.5 e 4.0 ed era termoresistente (figure 15C e D), inoltre, la frazione <3kDa conservava l'attività antimicrobica (figura 15E). Anche contro i ceppi intestinali il *CFS* riusciva ad esplicare la propria azione anti-microbica in maniera piuttosto rapida (figura 15F) e ad avere un potente effetto battericida, mentre

la minima concentrazione di *CFS* inibente la crescita delle cellule di tutti i ceppi intestinali utilizzati era *CFS* 50X al volume arbitrario di 5µl (figura 15G). Gli esperimenti finora compiuti hanno fatto supporre che la molecola anti-microbica contenuta nel *CFS*, poichè era attiva sia contro ceppi di *P. aeruginosa* isolati dall'espettorato o dai tamponi faringei di pazienti FC, sia contro ceppi patogeni isolati dall'intestino, fosse ad ampio spettro d'azione con un potente effetto battericida.



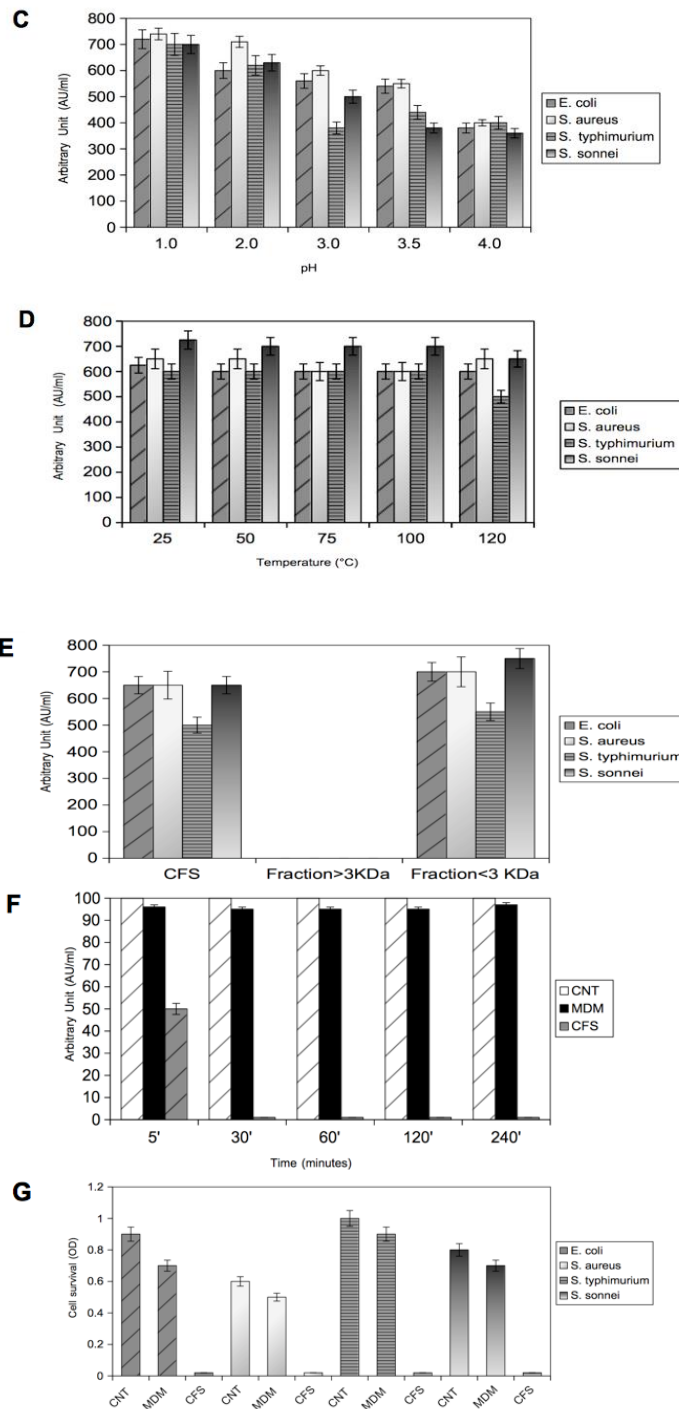


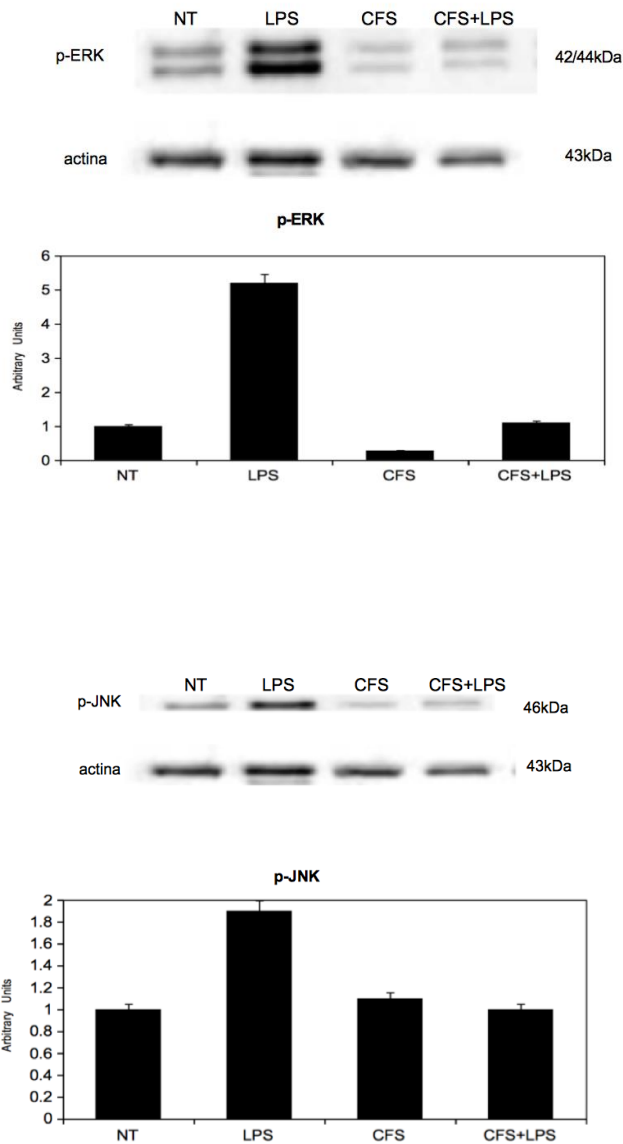
Figura 15 Attività anti-microbica del *CFS* contro ceppi patogeni intestinali (*E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* e *S. sonnei*). A) Attività del *CFS* di *L. gasseri* SF1109 cresciuto a vari pH (A) e a varie temperature (B); del *CFS* trattato a vari pH (C) e a varie temperature (D); del *CFS*, della Frazione <3kDa e della Frazione >3kDa (E); del *CFS* contro *E. coli* a vari tempi di incubazione (F). Determinazione della MIC (Minima Concentrazione Inibente la crescita) del *CFS* contro i ceppi intestinali (G). Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per sei repliche.

3.8 Studio dell'effetto del *CFS* su una linea di adenocarcinoma del colon (HCT116) in seguito ad induzione pro-infiammatoria con LPS purificato da *E. coli*.

I batteri lattici, oltre a produrre un gran numero di molecole anti-microbiche, sono in grado di stabilire complesse interazioni con le cellule del tratto gastro-intestinale e di regolare apoptosi, proliferazione ed infiammazione (Matsumoto M. *et al.* 2011). Dopo aver condotto esperimenti relativi all'azione anti-microbica del *CFS* di *L. gasseri* SF1109 ho condotto la mia attività sperimentale a verificare gli effetti del *CFS* su cellule di una linea di adenocarcinoma al colon (HCT116) in seguito ad induzione pro-infiammatoria con LPS (lipopolisaccaride) purificato da *E. coli*. Numerosi studi avevano dimostrato che l'interazione LPS-TLR4 potesse indurre l'attivazione delle MAPKs (ERK 1/2, JNK e p38) (Villena J. *et al.* 2013; Lu YC. *et al.* 2008), le quali svolgono un ruolo chiave nella regolazione dei processi pro-infiammatori. Sulla base di quanto era noto dalla letteratura, per verificare il possibile effetto anti-infiammatorio del *CFS*, le cellule HCT116 sono state pretrattate per 16h con *CFS* (5% v/v) e poi sono state

stimolate per 1h con LPS ad una concentrazione finale di 5µg/ml (Otte JM. *et al.* 2004). Dopo i trattamenti le cellule venivano raccolte, lisate e gli estratti proteici venivano analizzati mediante *western blotting*, per studiare i livelli quantitativi dei tre membri della superfamiglia delle MAPKs, l'actina era utilizzata come controllo di riferimento interno. L'actina rappresenta una proteina molto abbondante, espressa in modo costitutivo nelle cellule eucariotiche, e viene utilizzata per normalizzare le quantità di proteine estratte ed analizzate. Le barre d'errore sui grafici rappresentano gli errori standard per tre repliche. Come si può osservare in figura 16 (*lane* 1, NT), le cellule non trattate avevano un livello basale di p-ERK 1/2, p-JNK 1/2/3 e di p-p38. In risposta alla stimolo pro-infiammatorio indotto da LPS si attivavano in maniera molto evidente tutti e tre i membri delle MAPKs (figura 16 *lane* 2, LPS), invece, il pretrattamento con CFS (5% v/v) per 16h riduceva significativamente la fosforilazione indotta da LPS di ERK 1/2, JNK e p38 (figura 16 *lane* 4, CFS+LPS). E' importante sottolineare che il CFS da solo non aveva alcun effetto sull'attivazione delle MAPKs ma aveva un profilo di espressione paragonabile a quello delle cellule non trattate (figura 16 *lane* 3, CFS). Da questi esperimenti si può evincere che il CFS di *L. gasseri* SF1109, oltre ad avere un

effetto anti-microbico, è anche in grado di inibire la risposta pro-infiammatoria indotta da LPS, attraverso la regolazione negativa di ERK 1/2, JNK e p38.



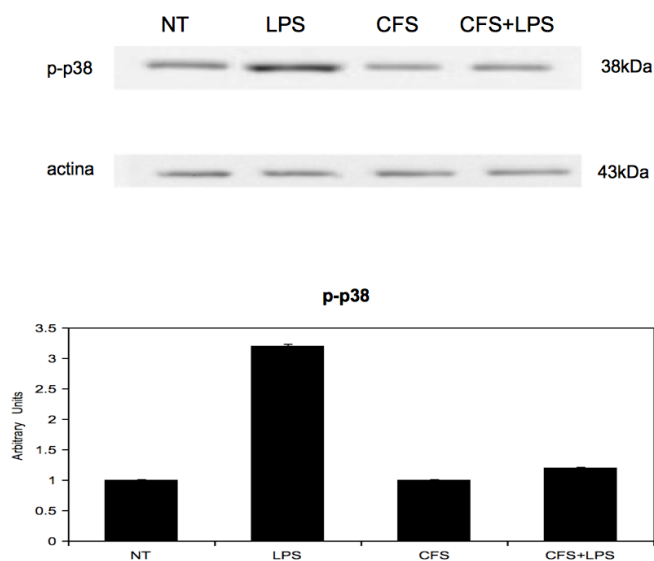


Figura 16 Effetti del CFS sulla fosforilazione delle MAPKs (ERK 1/2, JNK e p38) in seguito ad induzione con LPS. *Western blot* con anticorpi anti-pERK 1/2 (42/44kDa), anti-pJNK (46kDa), anti-p38 (38kDa) e anti-actina (43kDa) di estratti proteici da cellule HCT116 stimulate con (*cell-free supernatant*) CFS (5% v/v) e/o (lipolisaccharide) LPS 5 µg/ml. L'actina costituisce il controllo di riferimento. L'intensità di ciascuna banda, valutata mediante analisi ImageQuant, è stata normalizzata rispetto all'actina. Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per tre repliche.

3.9 Effetti del *CFS* sulla proliferazione cellulare delle HCT116.

Con gli esperimenti successivi ho verificato quale potesse essere l'effetto del *CFS* sulla proliferazione delle cellule HCT116. Per caratterizzare la risposta cellulare alle molecole secrete da *L. gasseri* SF1109 è stato analizzato il numero di cellule HCT116 e la vitalità cellulare dopo crescita in presenza di *CFS*. Le cellule venivano incubate per 16h con *CFS* di *L. gasseri* SF1109 (5% v/v) e poi veniva analizzato sia il numero di cellule, mediante conta in una cameretta di *Burker*, sia la vitalità cellulare mediante analisi MTS. Come mostrato nelle figure 17A e 17B non vi era alcuna variazione nella vitalità cellulare né nel numero di cellule, se si confrontavano le cellule di controllo (NT) con quelle trattate con *CFS* (5% v/v). Questi risultati facevano supporre che il *CFS* non avesse alcun effetto citotossico sulle cellule epiteliali del colon. Al fine di avere maggiori informazioni sulla risposta cellulare, è stata studiata la distribuzione del ciclo cellulare e l'espressione di marcatori molecolari del ciclo stesso in cellule HCT116 esposte a *CFS* e/o a LPS. La distribuzione del ciclo cellulare è stata analizzata mediante citometria di flusso, in cui il PI si legava al DNA in modo proporzionale alla quantità di DNA presente, un prerequisito fondamentale per l'analisi del ciclo cellulare in

citofluorimetria era che le cellule fossero in sospensione singola, poiché i *clumps* potrebbero alterare la valutazione del ciclo, quindi, attraverso tale analisi era possibile quantificare la percentuale di cellule in ogni fase del ciclo cellulare e monitorare l'effetto dei trattamenti effettuati. Tale analisi condotta sulle cellule HCT116 dimostrava che i profili delle cellule esposte ad LPS, a *CFS* e a *CFS*+LPS erano abbastanza conservati nelle varie fasi del ciclo cellulare e paragonabili al profilo delle cellule di controllo (NT) (figura 18 e tabella 1). Questi risultati suggerivano che il *CFS* di *L. gasseri* SF1109 non interferiva con la proliferazione delle cellule HCT116. In contemporanea è stata studiata l'espressione dei marcatori del ciclo cellulare p21WAF1 e ciclina D1, al fine di valutare gli effetti del *CFS* a livello molecolare. p21WAF1 è un regolatore della progressione del ciclo cellulare nella fase S, in particolare agisce come un inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti ed occupa un ruolo centrale nella regolazione del ciclo cellulare in molti tessuti (Weinberg WC. *et al.* 2002). In risposta a stimoli stressori di varia natura p53 interagisce con p21WAF1, il quale viene *up-regolato* e blocca il ciclo cellulare in G1, mentre la ciclina D1 è *down-regolata* (Rana C. *et al.* 2015). Dopo i trattamenti con *CFS* e/o LPS le cellule venivano raccolte, lisate e gli estratti proteici venivano analizzati mediante *western blotting* con gli

anticorpi anti-p21WAF1 e anti-ciclina D1, mentre l'actina era utilizzata come controllo. Tali esperimenti rivelavano che le cellule di controllo (NT) avevano un livello basale di p21WAF1 e ciclina D1 e tale livello era abbastanza conservato quando le cellule venivano pretrattate con *CFS* da solo oppure pretrattate e poi stimulate con LPS (figura 19). Tali esperimenti confermavano quanto ottenuto dagli studi di citometria di flusso e supportavano l'idea che il *CFS*, pur avendo un promettente effetto anti-infiammatorio, non aveva alcun effetto citotossico sul ciclo cellulare.

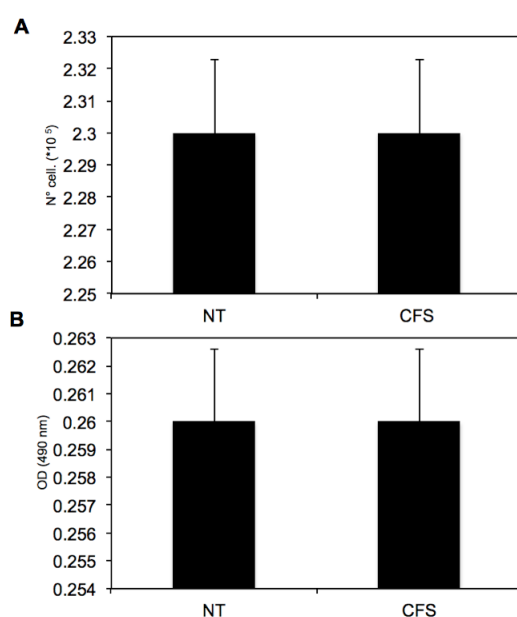


Figura 17 Effetti del *CFS* sul numero e la vitalità delle cellule HCT116. Le cellule venivano incubate con o senza *CFS* (5% v/v). A) Dopo 16h le cellule di controllo (NT) e quelle trattate con *CFS* venivano contate nella camera di *Burker*; o (B) incubate con 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-yl)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio e l'assorbanza viene misurata a 490 nm. Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per tre repliche.

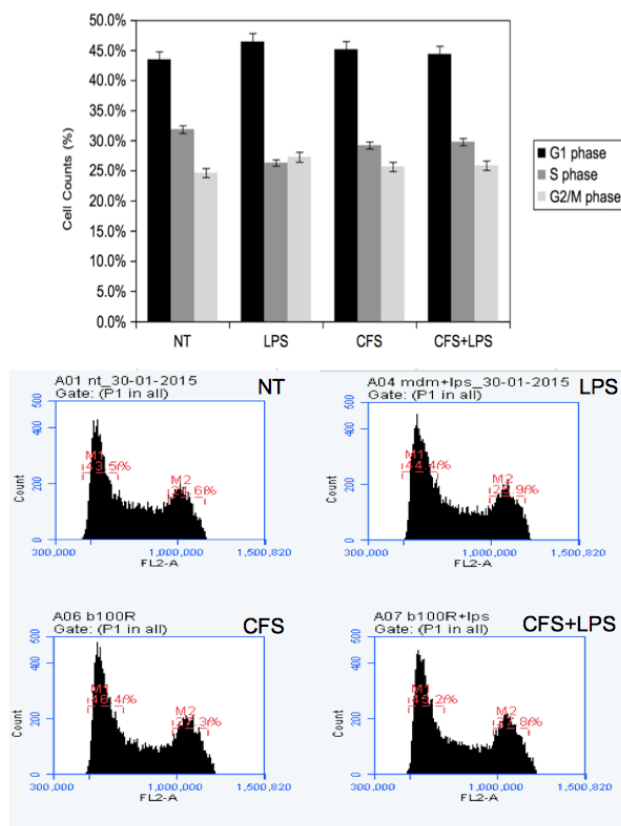


Figura 18 Effetti del CFS sulla proliferazione delle cellule HCT116. Le cellule venivano esposte a CFS (5% v/v) e/o a LPS (5 µg/ml). Dopo trattamento le cellule venivano raccolte e trattate per l'analisi di citometria di flusso.

	G1	S	G2
NT	43.5%	31.9%	24.6%
LPS	45.44%	26.3%	27.26%
CFS	45.15%	29.2%	25.65%
CFS+LPS	44.37	29.8%	25.90%

Tabella 1 Distribuzione in % delle cellule di controllo (NT), delle cellule pretrattate con CFS (5% v/v) e poi stimulate con LPS (5 µg/ml) nelle varie fasi del ciclo cellulare.

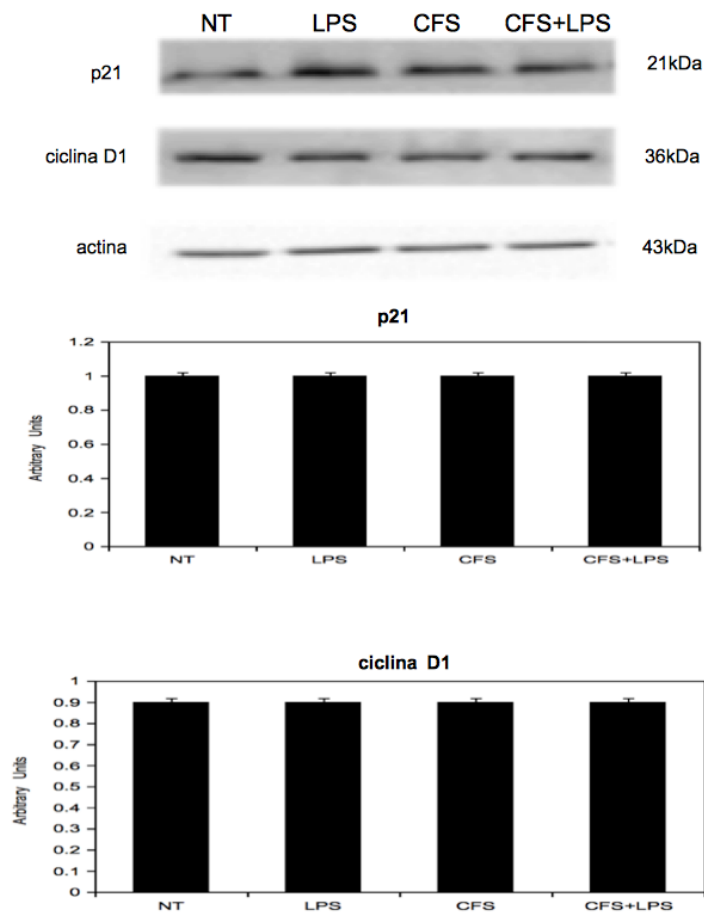


Figura 19 Influenza del *CFS* sul profilo d'espressione dei marcatori del ciclo cellulare, p21WAF1 e ciclina D1. *Western blot* con anticorpi anti-p21WAF1 (21kDa), anti-ciclina D1 (36kDa) e anti-actina (43kDa) di estratti proteici da cellule HCT116 stimulate con *CFS* (5% v/v) e/o LPS 5 µg/ml. L'actina era usata come controllo. L'intensità di ciascuna banda, valutata mediante analisi ImageQuant, è stata normalizzata rispetto all'actina. Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per tre repliche.

3.10 Caratterizzazione della molecola attiva del *CFS* mediante cromatografia di esclusione molecolare e saggi di attività anti-microbica delle frazioni ottenute.

Allo scopo di verificare se la molecola dotata di attività anti-microbica fosse la stessa di quella con attività anti-infiammatoria, il *CFS* di *L. gasseri* SF1109 è stato sottoposto ad una caratterizzazione chimica mediante cromatografia di esclusione molecolare (Superdex Peptide 10/300 GL³), in collaborazione con il gruppo di ricerca del Dott. Alessandro Pezzella (Dipartimento di Chimica, Università Federico II). Le 40 frazioni ottenute da tale cromatografia sono state in primo luogo saggiate per l'attività anti-microbica contro il ceppo AA2 di *P. aeruginosa*. Nel grafico in figura 20, per semplicità, sono state riportate solo le frazioni comprese tra la numero 8 e la numero 17. Come è possibile osservare (figura 20) le frazioni 11, 12, 13, 14 e 15 mostravano attività anti-microbica contro il ceppo indicatore, anche se in misura minore rispetto al *CFS* totale. Le frazioni antecedenti la numero 11 e quelle successive alla numero 15 erano prive di attività. Dopo aver verificato che le frazioni 11, 12, 13, 14 e 15 erano dotate di attività anti-microbica, esse sono state unite in una unica frazione chiamata frazione attiva (FA).

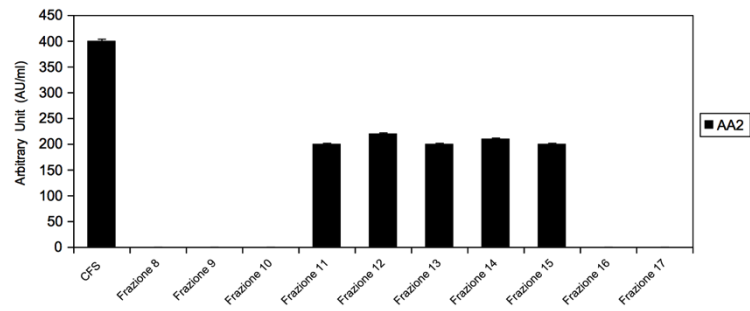


Figura 20 Grafico dell'attività anti-microbica del *CFS* e delle frazioni, ottenute dalla cromatografia, comprese tra la numero 8 e la numero 17. Sull'asse delle ordinate è riportata l'attività espressa in Unità arbitraria/ml (AU/ml) e sull'asse delle ascisse sono riportati il *CFS* e le varie frazioni ottenute dalla cromatografia. Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per tre repliche.

3.11 Studio dell'effetto della frazione attiva sulla linea cellulare HCT116 in seguito ad induzione pro-infiammatoria con LPS, purificato da *E. coli*.

La frazione attiva (FA), contenente molecole con attività anti-microbica, è stata saggiata sulla linea cellulare HCT116 in seguito ad induzione pro-infiammatoria con LPS, al fine di capire se fosse la stessa frazione a possedere anche attività anti-infiammatoria. Le cellule HCT116 venivano pretrattate per 16h parallelamente con la frazione attiva (5% v/v) e con il *CFS* (5% v/v). Dopo le 16h veniva aggiunto LPS per 1h alla concentrazione di 5µg/ml, le cellule venivano raccolte e gli estratti proteici sono stati analizzati per *western blotting* con un anticorpo anti-p-ERK 1/2, mentre l'actina era utilizzata come controllo. Come è possibile osservare in figura 21 le cellule non trattate avevano un livello basale di p-ERK 1/2, mentre in risposta alla stimolo pro-infiammatorio indotto da LPS, ERK 1/2 si attivava in misura molto evidente (figura 21 *lane 2*, LPS). Il pretrattamento con la frazione attiva riduceva significativamente la fosforilazione di ERK 1/2, indotta da LPS (figura 21 *lane 6*), proprio come accadeva quando le cellule venivano pretrattate con il *CFS*. La frazione attiva, come il *CFS*, non aveva alcun effetto sull'attivazione della MAPK ERK 1/2 ma aveva un profilo di espressione paragonabile a quello delle cellule non trattate. Questi

risultati hanno permesso di ipotizzare che la frazione attiva presenta sia attività anti-microbica che effetto anti-infiammatorio.

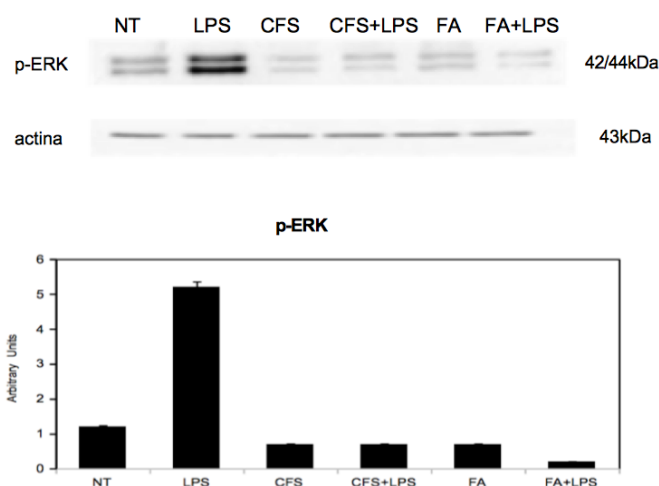


Figura 21 Effetti della frazione attiva sulla fosforilazione di ERK 1/2, in seguito ad induzione con LPS. *Western blot* con anticorpi anti-pERK 1/2 (42/44kDa) e anti-actina (43kDa) di estratti proteici da cellule HCT116 pretrattate con *CFS* e frazione attiva (5% v/v) e poi stimulate con LPS (5 μ g/ml). L'actina è usata come controllo. L'intensità di ciascuna banda, valutata mediante analisi ImageQuant, è stata normalizzata rispetto all'actina. Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per tre repliche.

3.12 Effetti della frazione attiva sulla proliferazione cellulare delle HCT116.

Al fine di avere informazioni circa gli effetti della frazione attiva sulla risposta cellulare e per validare i risultati ottenuti con il *CFS*, è stata studiata la distribuzione del ciclo cellulare

e l'espressione di marcatori molecolari del ciclo cellulare in cellule HCT116 pretrattate parallelamente con la frazione attiva (5% v/v) e con il *CFS* (5% v/v) e poi stimulate con LPS 5µg/ml. La distribuzione del ciclo cellulare è stata analizzata mediante citometria di flusso e dimostrava che i profili delle cellule esposte alla frazione attiva ed alla frazione attiva + LPS erano conservati nelle varie fasi del ciclo cellulare, paragonabili ai profili delle cellule di controllo (NT) e ai profili delle cellule esposte al *CFS* e al *CFS*+LPS. Questi risultati suggerivano che la frazione attiva, dotata di attività anti-microbica e anti-infiammatoria, proprio come il *CFS*, non interferiva con la proliferazione delle cellule HCT116 (figura 22 e tabella 2). In contemporanea è stata studiata l'espressione dei marcatori del ciclo cellulare p21WAF1 e ciclina D1, al fine di valutare gli effetti della frazione attiva a livello molecolare. Dopo aver pretrattato le cellule con la frazione attiva e il *CFS* e poi aver stimolato per 1h con LPS, le cellule venivano raccolte, lisate e gli estratti proteici sono stati analizzati mediante *western blotting* con gli anticorpi anti-p21WAF1 e anti-ciclina D1, mentre l'actina era utilizzata come controllo. I profili di espressione sia di p21WAF1 che della ciclina D1 per le cellule pretrattate con la frazione attiva e con il *CFS* erano paragonabili tra loro (figura 23). Tali esperimenti confermano quanto ottenuto

dagli studi di citometria di flusso e supportano l'idea che la frazione attiva allo stesso modo del *CFS*, pur avendo un promettente effetto anti-infiammatorio, non aveva alcun effetto citotossico sul ciclo cellulare.

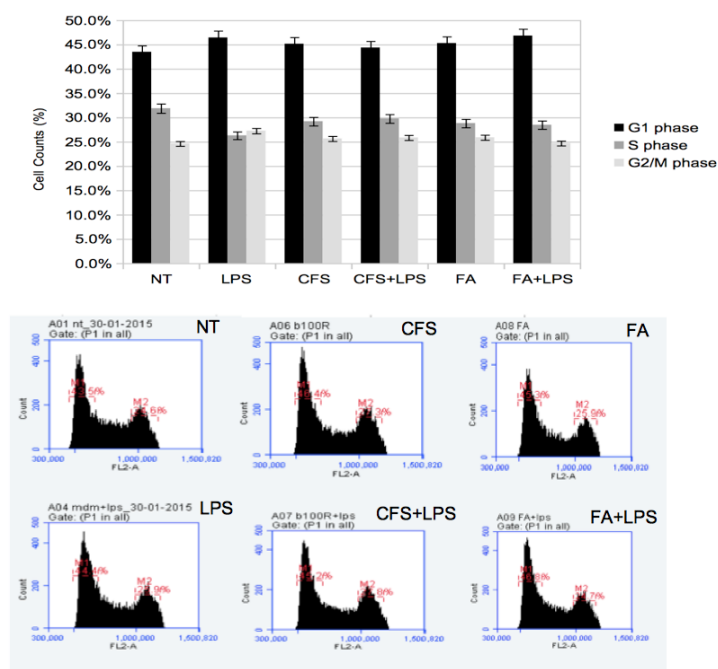


Figura 22 Effetti della frazione attiva sulla proliferazione delle cellule HCT116. Le cellule venivano pretrattate con *CFS* e frazione attiva (5% v/v) e poi stimulate con LPS (5 µg/ml). Dopo trattamento le cellule venivano raccolte e trattate per analisi di citometria di flusso.

	G1	S	G2
NT	43.5%	31.9%	24.6%
LPS	45.44%	26.3%	27.26%
CFS	45.15%	29.2%	25.65%
CFS+LPS	44.37	29.8%	25.90%
FA	45.29%	28.8%	25.90%
FA+LPS	46.82%	28.5%	24.70

Tabella 2 Distribuzione in % delle cellule di controllo (NT), delle cellule pretrattate con CFS e frazione attiva (5% v/v) e poi stimulate con LPS (5 µg/ml) nelle varie fasi del ciclo cellulare.

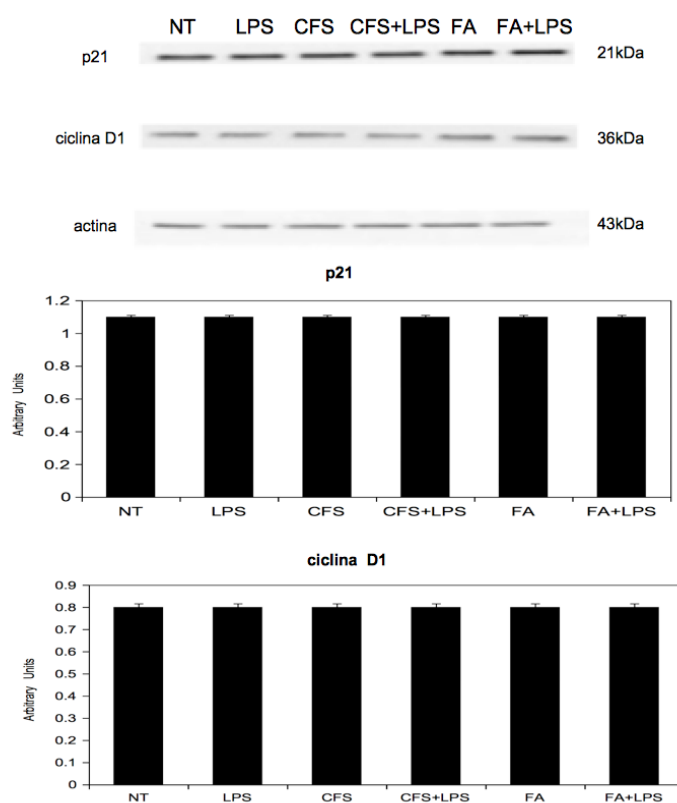


Figura 23 Influenza della frazione attiva sul profilo d'espressione dei marcatori del ciclo cellulare, p21WAF1 e ciclina D1. Western blot con anticorpi anti-p21WAF1 (21kDa), anti-ciclina D1 (36kDa) anti-actina (43kDa) di estratti proteici da cellule HCT116 pretrattate con CFS (5% v/v) e frazione attiva (5% v/v) e poi stimulate con LPS (5 µg/ml). L'actina è stata usata come controllo. L'intensità di ciascuna banda è stata valutata mediante analisi ImageQuant e normalizzata rispetto all'actina. Le barre d'errore rappresentano gli errori standard per tre repliche.

3.13 Caratterizzazione strutturale mediante AP-MALDI ed NMR della molecola contenuta nella frazione attiva.

La caratterizzazione chimica del *CFS* di *L. gasseri* SF1109 mediante cromatografia di esclusione molecolare aveva permesso di identificare 5 frazioni dotate di attività antimicrobica, unite in una frazione, chiamata frazione attiva (FA) che possedeva anche un effetto inibitore della risposta pro-infiammatoria indotta da LPS, proprio come il *CFS*. A tal punto la molecola contenuta nella frazione attiva è stata analizzata mediante tecniche spettroscopiche NMR monodimensionali (^1H , ^{13}C) e bidimensionali (^1H - ^1H e ^1H - ^{13}C) e mediante AP-MALDI. La combinazione delle tecniche AP-MALDI e NMR rappresenta un'analisi di *routine* per la caratterizzazione di metaboliti di piccole dimensioni. Tale caratterizzazione preliminare consentiva di verificare la presenza nella molecola di unità aminoacidiche. Tuttavia, a questo livello di investigazione non era possibile ottenere la struttura finale del metabolita attivo e non era inoltre possibile escludere che essa contenesse alcune unità non riferibili ad aminoacidi standard. Inoltre lo spettro ^{13}C mostrava un'abbondante presenza di glucosio probabilmente derivante dal mezzo di coltura utilizzato. In ogni caso per

sottrazione del segnale NMR del glucosio si sono utilizzati i segnali risultanti nella successiva analisi spettroscopica. Dall'analisi dello spettro di massa si è potuto dedurre che la massa molecolare della frazione attiva è di 1333Da, compatibile con una struttura polipeptidica costituita da 12 aminoacidi. Anche se questi dati non sono ancora sufficienti per ottenere una struttura completa, da una preliminare caratterizzazione si è accertata la presenza nella molecola di alcuni aminoacidi aromatici tra i quali la Tirosina e la Fenilalanina (figura 24). Il resto della caratterizzazione è in via di sviluppo mentre scrivo questa tesi. Appare verosimile al momento che alcuni aminoacidi che costituiscono la restante parte della struttura primaria, potrebbero essere modificati.

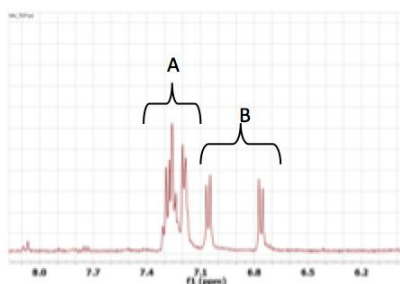


Figura 24. Regione aromatica dello spettro ^1H NMR della frazione attiva. I segnali evidenziati sono quelli della fenilalanina (A) e della tirosina (B).

DISCUSSIONE

La diversità microbica dell'intestino umano è il risultato di una co-evoluzione tra l'ospite e le comunità microbiche che compongono il microbiota intestinale, il quale è in grado di modulare l'attività di molti organi e tessuti e al tempo stesso può essere manipolato attraverso la dieta, l'utilizzo di prebiotici (sostanze che, presenti nel cibo, non vengono assorbite dall'organismo ma sono utilizzate dalla flora intestinale) e dei probiotici (organismi vivi che somministrati in adeguate quantità apportano benefici all'ospite) al fine di garantire il benessere dell'organismo (Lin CS. *et al.* 2014). La capacità del microbiota intestinale di prevenire la colonizzazione di specie patogene avviene anche attraverso la produzione e la secrezione di molecole anti-microbiche e prende il nome di "resistenza alla colonizzazione", attraverso cui il microbiota protegge se stesso dall'attacco di microrganismi esogeni (Schipa S. *et al.* 2014). Tra i principali colonizzatori del tratto gastro-intestinale vi sono i batteri acido lattici, i quali hanno sempre suscitato molto interesse da parte dei ricercatori, sia per il loro uso come

batteri probiotici sia per la capacità di produrre metaboliti anti-microbici come batteriocine, diacetile, perossido d'idrogeno, acetaldeide, acidi organici e biossido di carbonio (Enan G. *et al.* 2013). I probiotici, oltre alla cospicua produzione di molecole di natura anti-microbica, hanno anche la capacità di modulare i processi infiammatori (O'Mahony L. *et al.* 2005), ad esempio molecole prodotte da *B. longum subsp. infantis* mostrano effetti anti-infiammatori mediante la riduzione della concentrazione nel colon di LPS, molecola responsabile di un'ampia varietà di infiammazioni croniche (Lu YC *et al.* 2008). Il riconoscimento dell'LPS è mediato dal complesso CD14/TLR4 nelle cellule epiteliali dell'intestino e in cellule del sistema immunitario come macrofagi, cellule B, cellule dendritiche. A seguito di tale riconoscimento si innesca una cascata di segnalazioni intracellulari, che porta alla secrezione di citochine pro-infiammatorie, come IL-4, IL-1 β , TNF- α (Cani P. *et al.* 2007; Mehta NN. *et al.* 2010), pertanto, i ceppi probiotici sono di straordinaria importanza per modulare il tono pro-infiammatorio (Rodes L. *et al.* 2013).

In questo progetto di tesi ho studiato l'attività anti-microbica e le proprietà anti-infiammatorie del *CFS* (Cell Free Supernatant) del ceppo *L. gasseri* SF1109. Nella prima parte di questo progetto ho analizzato il *CFS* di un pannello

di Lattobacilli, disponibili in laboratorio ed isolati da biopsie ileali, mediante saggi di attività anti-microbica contro ceppi patogeni di *P. aeruginosa* e da tale analisi è emerso che il CFS del ceppo *L. gasseri* SF1109 esercitava la maggiore azione anti-microbica contro i ceppi indicatori utilizzati. L'azione anti-microbica dei batteri lattici contro i ceppi di *P. aeruginosa* è stata oggetto di studi recenti, nei quali si dimostra che l'uso di batteri probiotici può prevenire o rallentare la colonizzazione polmonare da parte di *P. aeruginosa* (Alexandre Y. *et al.* 2014). Dopo aver selezionato il miglior ceppo dotato di attività anti-microbica (*L. gasseri* SF1109), ho ottimizzato la produzione della/delle molecole anti-microbiche, variando il pH e la temperatura di crescita del ceppo *L. gasseri* SF1109. Dalle crescite condotte in terreno minimo è emerso che la condizione ottimale per la produzione è di pH 6.0 alla temperatura di 37°C. Numerosi studi presenti in letteratura dimostravano che la produzione di molecole anti-microbiche da parte dei batteri lattici poteva essere influenzata dal pH e dalla temperatura, ad esempio *P. acidilactici* produceva la maggiore quantità di pediocina a 37°C (Biswas SR. *et al.* 1991), mentre il pH ottimale di crescita per la maggiore produzione di Sakacina K da *L. sakei* era pH 5.0 (Leroy F. *et al.* 1999). Dopo aver caratterizzato le migliori condizioni di pH e temperatura di crescita del ceppo

L. gasseri SF1109 per la maggiore produzione di molecole anti-microbiche, ho posto l'attenzione sugli effetti di pH e temperatura sull'attività anti-microbica del *CFS*, dimostrando che esso era maggiormente attivo in un intervallo di pH compreso tra 3.5 e 4.0, e conserva l'attività anti-microbica anche dopo riscaldamento a 120°C per 30'.

Successivamente, mediante frazionamento con filtri con *cut-off* di 3KDa, ho dimostrato che la formazione dell'alone di inibizione si osservava soltanto utilizzando la frazione minore di 3KDa, suggerendo, quindi, che l'eventuale molecola ad attività anti-microbica avesse una massa molecolare minore o uguale a 3kDa. In letteratura è noto che molte molecole anti-microbiche secrete dai batteri acido lattici hanno dimensioni inferiori a 3kDa, ad esempio sono stati isolati, identificati e caratterizzati sette piccoli peptidi da *Lactobacillus GG* che hanno una massa di circa 1kDa e che esercitano azione battericida sia contro *Gram* positivi che contro *Gram* negativi (Lu R. *et al.* 2009), anche *L. casei* AST18 secerne piccole molecole, note come: cyclo-(Leu-Pro), 2,6-difenilpiperidina e 5,10-dietossi-2,3,7,8-tetraidro-1H,6H-dipirrolo[1,2-a;1',2'-d]pirazina, le quali hanno una massa <1kDa e inoltre posseggono un'attività anti-fungina (Li H. *et al.* 2012).

Successivamente ho dimostrato che il *CFS* di *L. gasseri* SF1109 possiede un meccanismo d'azione rapido nonché un potente effetto battericida, che si realizza già dopo 30' di incubazione con le cellule dei ceppi di *P. aeruginosa* utilizzati. Pertanto, tale ceppo si colloca bene nell'ambito dell'isolamento di nuove molecole anti-microbiche che potrebbero essere particolarmente efficaci nel combattere infezioni da parte di ceppi patogeni come *P. aeruginosa*, utilizzati in questo progetto di tesi, isolati da pazienti affetti da Fibrosi Cistica (Bragonzi A. *et al.* 2006; 2009). Gli esperimenti di attività anti-microbica sono stati supportati da esperimenti di microscopia a fluorescenza, grazie ai quali ho evidenziato che quando il *CFS* veniva incubato per 30' con le cellule di *P. aeruginosa*, esplicava la propria azione battericida a livello della membrana plasmatica. Tali risultati sono in accordo con numerosi studi presenti in letteratura, ad esempio la Gassericina A agisce direttamente nella membrana citoplasmatica della cellula bersaglio e causa morte cellulare mediante efflusso di ioni potassio (Kawai Y. *et al.* 1994), mentre la Nisina Z causa la formazione di canali nella membrana di *L. monocytogenes* con fuoriuscita di ioni Potassio e Fosfato (Pattanayauying R. *et al.* 2014). La molecola ad attività anti-microbica contenuta nel *CFS* ha un ampio spettro d'azione, poiché oltre ad esercitare una forte

azione anti-microbica contro i ceppi di *P. aeruginosa* isolati da pazienti affetti da Fibrosi Cistica, ho verificato che è molto attiva anche contro ceppi Gram positivi e negativi isolati dall'intestino.

Poichè *L. gasseri* SF1109 è stato isolato dall'intestino umano, ho ritenuto nell'ambito della mia attività di dottorato di indagare gli effetti del *CFS* su una linea di cellule di adenocarcinoma del colon (HCT116) in seguito ad induzione pro-infiammatoria con LPS, il quale attiva le MAPKs (ERK 1/2, JNK e p38) ed ho dimostrato che il *CFS* è in grado di inibire la risposta pro-infiammatoria indotta da LPS attraverso la regolazione negativa di ERK 1/2, JNK e p38. Tali risultati consentono di ipotizzare l'esistenza di un ruolo anti-infiammatorio svolto dalle molecole contenute nel *CFS* di *L. gasseri* SF1109. Tale risultato è in accordo con quanto riportato in letteratura a proposito di ceppi di Lattobacilli e Bifidobatteri che sono in grado di abbassare le concentrazioni di LPS nel colon, con conseguente riduzione dei livelli di infiammazione (Rodes L. *et al.* 2013). L'analisi di citometria di flusso e gli studi che ho condotto sui marcatori del ciclo cellulare, quali p21WAF1 e ciclina D1, mi hanno consentito di concludere che il *CFS* non ha alcun effetto sulla variazione della capacità di proliferazione delle cellule HCT116, e non presenta alcun effetto citotossico.

La caratterizzazione chimica della molecola contenuta nel *CFS* è stata realizzata mediante cromatografia per gel filtrazione. Ho in questo modo isolato una frazione attiva, che oltre a presentare attività anti-microbica possiede anche un effetto anti-infiammatorio sulla linea epiteliale del colon in seguito ad induzione pro-infiammatoria con LPS. L'analisi di Spettrometria di Massa (AP-MALDI) e l'analisi NMR mi hanno inoltre permesso di identificare nella frazione attiva la presenza di una piccola molecola di 1333Da compatibile con una struttura polipeptidica costituita da 12 aminoacidi. Mentre scrivo questa tesi sono state identificate solo due unità aminoacidiche costituenti la molecola attiva: una Tirosina e una Fenilalanina. Il resto della struttura è in via di caratterizzazione, probabilmente alcuni aminoacidi che costituiscono la restante parte della struttura primaria, potrebbero essere modificati. Una volta nota l'intera sequenza aminoacidica, sarà possibile ottenere in forma pura il peptide al fine di validare i risultati ottenuti con il *CFS* sia su cellule batteriche che su cellule eucariotiche e di realizzare studi più dettagliati per comprendere il meccanismo d'azione del piccolo peptide e per poter iniziare studi di somministrazione della molecola *in vivo*.

BIBLIOGRAFIA

Alexandre Y, Le Berre R1, Barbier G, Le Blay G (2011) Screening of *Lactobacillus* spp. for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections. *BMC Microbiol.* 14:107.

Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA and Gordon JI (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307(5717):1915-20.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45(4):493-6

Bermudez-Brito M1, Muñoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Matencio E, Bernal MJ, Romero F, Gil A (2013) Cell-free culture supernatant of *Bifidobacterium breve* CNCM I- 4035 decreases pro-inflammatory cytokines in human dendritic cells challenged with *Salmonella typhi* through TLR activation. *PLoS One* 8: e59370.

Biffi A, Coradini D, Larsen R, Riva L, Di Fronzo G (1997) Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutr Cancer.* 28: 93–99. *Biomed J.* 37(5):259-68.

Biswas SR, Ray P, Johnson MC, Ray B (1991) Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl Environ Microbiol.* 57(4):1265-7.

Bjorksten B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M (1999). The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 29, 342–346.

Bottcher MF, Nordin EK, Sandin A, Midtvedt T, Bjorksten B (2000). Microflora-associated characteristics in faeces from allergic and nonallergic infants. *Clin Exp Allergy* 30, 1590–1596.

Bragonzi A1, Wiehlmann L, Klockgether J, Cramer N, Worlitzsch D, Döring G, Tümmler B (2006) Sequence diversity of the mucABD locus in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology*. 52(Pt 11):3261-9.

Bragonzi A1, Paroni M, Nonis A, Cramer N, Montanari S, Rejman J, Di Serio C, Döring G, Tümmler B (2009) *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. *Am J Respir Crit Care Med*. 180(2):138-45.

Braun V, Pils H, Gross P (1994) Colicins: structures, modes of action transfer through membranes and evolution. *Arch Microbiol*. 161(3):199-206.

Bruzzese E, Raia V, Gaudiello G, Polito G, Buccigrossi V, Formicola V, Guarino A (2004). Intestinal inflammation is a frequent feature of cystic fibrosis and is reduced by probiotic administration. *Aliment Pharmacol Ther*. 20(7):813-9.

Bruzzese E, Raia V, Spagnuolo MI, Volpicelli M, De Marco G, Maiuri L, Guarino A (2007). Effect of *Lactobacillus GG* supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *Clin Nutr*. 26(3):322-8.

Candela M, Guidotti M, Fabbri A, Brigidi P, Franceschi C, Fiorentini C (2011) Human intestinal microbiota: cross-talk with the host and its potential role in colorectal cancer. *Crit Rev Microbiol*. 37: 1–14.

Cani PD1, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761- 1772.

Charlson ES¹, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A, Bushman FD, Collman RG (2011). Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med.* 184(8):957-63.

Chase MA¹, Wheeler DS, Lierl KM, Hughes VS, Wong HR, Page K (2007) Hsp72 induces inflammation and regulates cytokine production in airway epithelium through a TLR4- and NF- κ B dependent mechanism. *J Immunol* 179: 6318–6324.

Chen YM, Fang WF, Kao HC, Chen HC, Tsai YC, Shen LS, Li CL, Chang HC, Huang KT, Lin MC, Wang CC¹, Chao TY (2014) Influencing factors of successful eradication of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in the respiratory tract with aerosolized colistin. *Biomed J.* 37(5):314-20.

Chen YS, Jan RL, Lin YL, Chen HH, Wang JY (2010). Randomized placebo-controlled trial of lactobacillus on asthmatic children with allergic rhinitis. *Pediatr Pulmonol.* 45(11):1111-20.

Chung H, Kasper DL (2010) Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. *Curr. Opin. Immunol.* 22(4):455-60.

Chung SW, Lee JH, Choi KH, Park YC, Eo SK, Rhim BY, Kim K (2009) Extracellular heat shock protein 90 induces interleukin-8 in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 378: 444–449.

Claes IJ, Segers ME, Verhoeven TL, Dusselier M, Sels BF, De Keersmaecker SC, Vanderleyden J, Lebeer S (2012) Lipoteichoic acid is an important microbe-associated molecular pattern of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microb Cell Fact.* 11:161.

Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R (2012) The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell.* 148(6):1258-70.

Coombes, JL and Powrie F (2008) Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 435- 446.

Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.* 3(10):777-88.

Cotter PD, Ross RP, Hill C (2013) Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 11(2):95-105.

Cox MJ, Allgaier M, Taylor B, Baek MS, Huang YJ, Daly RA, Karaoz U, Andersen GL, Brown R, Fujimura KE, Wu B, Tran D, Koff J, Kleinhenz ME, Nielson D, Brodie EL, Lynch SV (2010). Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients.

Dalbello F, Clarke C, Ryan L, Ulmer H, Schober T, Strom K, Sjogren J, Vansinderen D, Schnurer J, Arendt E (2007) Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J Cereal Sci* 45:309–318.

De Vuyst L1, Vandamme EJ (1992) Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J Gen Microbiol.* 138(3):571-8.

Di Luccia B, Manzo N, Baccigalupi L, Calabrò V, Crescenzi E, Ricca E, Pollice A (2013) *Lactobacillus gasseri* SF1183 affects intestinal epithelial cell survival and growth. *Plos One* 8(7): e69102.

Di Luccia B, Manzo N, Vivo M, Galano E, Amoresano A, Crescenzi E, Pollice A, Tudisco R, Infascelli F, Calabrò V (2013) A Biochemical and Cellular Approach to Explore the Antiproliferative and Prodifferentiative Activity of *Aloe Arborescens* Leaf Extract. *Phytother Res.* 27(12):1819-28.

Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA (2002) Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 68(6):2950-8.

Drider D, Fimland G, Hechard Y, McMullen LM, Prevost H (2006) The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70(2):564-82.

Droste, JH, Wieringa MH, Weyler JJ, Nelen VJ, Vermeire PA, Van Bever HP (2000) Does the use of antibiotics in early childhood increase the risk of asthma and allergic disease? *Clin Exp Allergy* 30, 1547–1553.

Enan G, Abdel-Shafi S, Ouda S, Negm S (2013) Novel antibacterial activity of lactococcus lactis subspecies lactis z11 isolated from zabady. *Int J Biomed Sci.* 9(3):174-80.

Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, Ishizaki A (2000) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev.* 24(1):85-106.

Erb-Downward JR1, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, Young VB, Toews GB, Curtis JL, Sundaram B, Martinez FJ, Huffnagle GB (2011). Analysis of the lung microbiome in the “healthy” smoker and in COPD. *PLoS One* 6, e16384.

Fakhry S1, Manzo N, D'Apuzzo E, Pietrini L, Sorrentini I, Ricca E, De Felice M, Baccigalupi L (2009) Characterization of intestinal bacteria tightly bound to the human ileal epithelium. *Res Microbiol.* 160(10):817-23.

FangY, and Polk DB (2002) Probiotic bacterium prevents Cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 277(52):50959-65.

Fekete S1, Beck A2, Veuthey JL3, Guillarme D (2014) Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *J Pharm Biomed Anal.* 101:161-73.

Fichera GA, Giese G (1994) Non-immunologically mediated cytotoxicity of *Lactobacillus casei* and its derivative peptidoglycan against tumor cell lines. *Cancer Lett.* 85: 93–103.

Finamore A, Roselli M, Britti MS, Merendino N, Mengheri E (2012) *Lactobacillus rhamnosus* GG and

Bifidobacterium animalis MB5 induce intestinal but not systemic antigen-specific hyporesponsiveness in ovalbumin-immunized rats. *J Nutr.* 142(2):375-81.

Finamore A, Roselli M, Imbinto A, Seeboth J, Oswald IP, Mengheri E (2014) *Lactobacillus amylovorus* inhibits the TLR4 Inflammatory Signaling Triggered by Enterotoxigenic *Escherichia coli* via Modulation of the Negative Regulators and Involvement of TLR2 in Intestinal Caco-2 Cells and Pig Explants. *PLoS ONE* 9(4): e94891.

Fujita K, Ichimasa S, Zendo T, Koga S, Yoneyama F, Nakayama J, Sonomoto K (2007) Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 73(9):2871-7.

Fujiya M, Musch MW, Nakagawa Y, Hu S, Alverdy J, Kohgo Y, Schneewind I, Jabri B, Chang EB (2007) The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell Host Microbe* 1: 299–308.

Gaillard-Gendron S, Vignon D, Cottenceau G, Graber M, Zorn N, van Dorsselaer A, Pons AM (2000) Isolation, purification and partial amino acid sequence of a highly hydrophobic new microcin named microcin L produced by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 193(1):95-8.

Gerez C, Torino M, Rollan G, Fontdevaldez G (2009) Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with anti- fungal properties. *Food Control* 20:144–148.

Gollwitzer ES1, Marsland BJ (2014) Microbiota abnormalities in inflammatory airway diseases - Potential for therapy. *Pharmacol Ther.* 2014 Jan;141(1):32-9.

Gong Z, Luna Y, Yu P, Fan H (2014) *Lactobacilli* inactivate *Chlamydia trachomatis* through Lactic Acid but Not H₂O₂. *PLoS ONE* 9(9): e107758.

Gupta R, Sarkar S, Srivastava S (2014) In vivo toxicity assessment antimicrobial peptides (AMPs LR₁₄) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 in *Drosophila melanogaster*. *Probiotics and antimicrobial proteins* 6 (1) 59-67.

Gutkowski P, Madaliński K, Grek M, Dmeńska H, Syczewska M, Michalkiewicz J (2010). Effect of orally administered probiotic strains *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in children with atopic asthma. *Cent Eur J Immunol* 35, 233–238.

Haddad JJ, Abdel-Karim NE (2011) NF-κB cellular and molecular regulatory mechanisms and pathways: Therapeutic pattern or pseudoregulation? *Cell Immunol* 271: 5–14.

Haller D, Antoine JM, Bengmark S, Enck P, Rijkers GT, Lenoir-Wijnkoop I. (2010) Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: probiotics in chronic inflammatory bowel disease and the functional disorder irritable bowel syndrome. *J Nutr* 140: 690S–697S.

Hart AL1, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ (2005) Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 129: 50–56.

Hausmann M1, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spöttl T, Andus T, Schölmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G (2002) Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 122: 1987–2000.

Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW, Tagg JR (2007) The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria.

Herbst, T., Sichelstiel, A., Schar, C., Yadava, K., Burki, K., Cahenzli, J., et al. Herbst T1, Sichelstiel A, Schär C, Yadava K, Bürki K, Cahenzli J, McCoy K, Marsland BJ, Harris NL (2011). Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. *Am J Respir Crit Care Med*. 184(2):198-205.

Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF, Cookson WO (2010). Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One*. 5(1):e8578.

Hilty M1, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF, Cookson WO (2010). Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* 5, e8578.

Huang YJ1, Nelson CE, Brodie EL, Desantis TZ, Baek MS, Liu J, Woyke T, Allgaier M, Bristow J, Wiener-Kronish JP, Sutherland ER, King TS, Icitovic N, Martin RJ, Calhoun WJ, Castro M, Denlinger LC, Dimango E, Kraft M, Peters SP, Wasserman SI, Wechsler ME, Boushey HA, Lynch SV; National Heart, Lung, and Blood Institute's Asthma Clinical Research Network (2011). Air- way microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 127(2):372-381.e1-3.

Iyapparaj P1, Maruthiah T, Ramasubburayan R, Prakash S, Kumar C, Immanuel G, Palavesam A (2013) Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus* sp. MSU3IR against shrimp bacterial pathogens. *Aquat Biosyst*. 9(1):12.

Iyer C, Kusters A, Sethi G, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB, Versalovic J (2008) Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF-kB and MAPK signaling. *Cellular Microbiology* 10: 1442–1452.

Jamalifar H, Rahimi H, Samadi N, Shahverdi A, Sharifian Z, Hosseini F, Eslahi H, Fazeli M (2011) Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi- drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Microbiol*. 3(1):21-5.

Jiménez-Díaz R, Rios-Sánchez RM, Desmazeaud M, Ruiz-Barba JL, Piard JC (1993) Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus*

plantarum LPCO10 isolated from a green olive fermentation. Appl. Environ. Microbiol. **59**:1416–1424.

Joerger MC and Klaenhammer TR (1986) Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol. **167**:439–446.

Kato I, Endo-Tanaka K, Yokokura T (1998) Suppressive effects of the oral administration of *Lactobacillus casei* on type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. Life Sci. **63**(8):635-44.

Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI (2011) Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. Nature. **474**(7351):327-36.

Kaway Y, Saito T, Toba T, Samant SK, itoh T (1994) Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (Gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. Biosci Biotech Biochem. **58**(7):1218-1221.

Keren T, Yarmus M, Halevy G, Shapira R (2004) Immunodetection of the bacteriocin lacticin RM: analysis of the influence of temperature and Tween 80 on its expression and activity. Appl Environ Microbiol. **70**(4):2098-104.

Kim HG1, Kim NR, Gim MG, Lee JM, Lee SY, Ko MY, Kim JY, Han SH, Chung DK (2008) Lipoteichoic Acid Isolated from *Lactobacillus plantarum* Inhibits Lipopolysaccharide-Induced TNF- α Production in THP-1 Cells and Endotoxin Shock in Mice. J Immunol. **180**(4):2553-61.

Kim JY, Woo HJ, Kim YS, Lee JH (2002) Screening for antiproliferative effects of cellular components from lactic acid bacteria against human cancer cell lines. Biotechnol Lett **24**: 1431–1436.

Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **12**:39–86. 9

Klein C, Kaletta C, and Entian KD (1993) Biosynthesis of genes involved in biosynthesis of lantibiotic subtilin. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:296–303.

Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC (2010) Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol.* 8 (3): 171–184.

Leroy F, De Vuyst L (1999) Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl Environ Microbiol.* 65(3):974-81.

Li H, Liu L, Zhang S, Cui W, Lv J (2012) Identification of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Microbiol* 65:156–161.

Li M, Wang B, Zhang M, Rantalainen M, Wang S, Zhou H, Zhang Y, Shen J, Pang X, Zhang M, Wei H, Chen Y, Lu H, Zuo J, Su M, Qiu Y, Jia W, Xiao C, Smith LM, Yang S, Holmes E, Tang H, Zhao G, Nicholson JK, Li L, Zhao L (2008) Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *PNAS* 105(6):2117-22.

Lim BK, Mahendran R, Lee YK, Bay BH (2002) Chemopreventive effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of a subcutaneously implanted bladder cancer cell line in the mouse. *Jpn J Cancer Res* 93: 36–41.

Lin CS, Chang CJ, Lu CC, Martel J, Ojcius DM, Ko YF, Young JD, Lai HC (2014) Impact of the gut microbiota, prebiotics, and probiotics on human health and disease. *Biomed J.* 37(5):259-68.

Long KZ, Rosado JL, Santos JI, Haas M, Al Mamun A, DuPont HL, Nanthakumar NN, Estrada-

Garcia T (2010) Associations between mucosal innate and adaptive immune responses and resolution of diarrheal pathogen infections. *Infect Immun* 78: 1221–1228.

Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 489(7415):220-30.

Lu R, Fasano S, Madayiputhiya N, Morin NP, Nataro J, Fasano A (2009) Identification, and Characterization of Small Bioactive Peptides From *Lactobacillus* GG Conditional Media That Exert Both Anti-Gram-negative and Gram-positive Bactericidal Activity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 49(1):23-30.

Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS (2008) LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42: 145- 151.

Macpherson AJ, Harris NL (2004) Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 4: 478–485.

Madan JC, Koestler DC, Stanton BA, Davidson L, Moulton LA, Housman ML, Moore JH, Guill MF, Morrison HG, Sogin ML, Hampton TH, Karagas MR, Palumbo PE, Foster JA, Hibberd PL, O'Toole GA (2012). Serial analysis of the gut and respiratory microbiome in cystic fibrosis in infancy: interaction between intestinal and respiratory tracts and impact of nutritional exposures. *MBio*. 3(4). pii: e00251-12.

Madan JC1, Koestler DC, Stanton BA, Davidson L, Moulton LA, Housman ML, Moore JH, Guill MF, Morrison HG, Sogin ML, Hampton TH, Karagas MR, Palumbo PE, Foster JA, Hibberd PL, O'Toole GA (2012). Serial analysis of the gut and respiratory microbiome in cystic fibrosis in infancy: interaction between intestinal and respiratory tracts and impact of nutritional exposures. *MBio*. 3(4). pii: e00251-12.

Magnusson J, Schnurer J (2001) *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteaceous antifungal compound. *Appl Environ Microbiol* 67:1–5.

Manzo N, Di Luccia B, Isticato R, D'Apuzzo E, De Felice M, Ricca E (2013) Pigmentation and sporulation are alternative cell fates in *Bacillus pumilus* SF214. *PLoS One*. 8(4):e62093.

Magnusson J, Strom K, Roos S, Sjogren J, Schnurer J (2003) Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 219: 129–135.

Maqueda M, Sanchez-Hidalgo M, Fernandez M, Montalban-Lopez M, Valdivia E, Martinez-Bueno M (2008) Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 32(1):2-22.

Mataragas M, Drosinos EH, Tsakalidou E, Metaxopoulos E (2004) Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 85(3):191-8.

Matsumoto M, Kurihara S, Kibe R, Ashida H, Benno Y (2011) Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. *PLoS One* 6: e23652.

McAuliffe O, Ross RP, Hill C (2001) Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev*. 25(3):285-308.

Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN (2000) Expression chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene macrophages: Deregulation of cytokine, transduction in endotoxin-tolerated mouse inhibition of lipopolysaccharide- induced signal. *J Immunol* 164: 5564–5574.

Mehta NN1, McGillicuddy FC, Anderson PD, Hinkle CC, Shah R, Pruscino L, Tabita-Martinez J, Sellers KF, Rickels MR, Reilly MP (2010) Experimental endotoxemia induces adipose inflammation and insulin resistance in humans. *Diabetes* 59: 172- 181.

Melmed G, Thomas LS, Lee N, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, Zhou Y, Hu B, Arditi M,

Abreu MT (2003) Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2- dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol* 170: 1406–1415.

Mkrtchyan H, Gibbons S, Heidelberg S, Zloh M, Khalatbari Limaki H (2010) Purification, characterization and identification of acidicin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain Narine. *Int J Antimicrob Agents*. 35(3):255-60.

Møortvedt-Abildgaard CI, Nissen-Meyer J, Jelle B, Grenov B, Skaugen M, Nes IF (1995) Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl Environ Microbiol*. 61(1):175-9.

Mortvedt-Abildgaard CI, Nissen-Meyer J, Jelle B, Grenov B, Skaugen M, Nes IF (1995) Production and pH-Dependent Bactericidal Activity of Lactocin S, a Lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl Environ Microbiol*. 61(1):175-9.

Moue M, Tohno M, Shimazu T, Kido T, Aso H, Saito T, Kitazawa H (2008) Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. *Biochim Biophys Acta* 1780: 134–144.

Moue M, Tohno M, Shimazu T, Kido T, Aso H, Saito T, Kitazawa H (2008) Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. *Biochim Biophys Acta* 1780: 134–144.

Nakamura H, Karakawa S1, Watanabe A1, Kawamata Y1, Kuwahara T1, Shimbo K1, Sakai R (2015) Measurement of ¹⁵N enrichment of glutamine and urea cycle amino acids derivatized with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate using liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2015 Feb 11. pii: S0003-2697(15)00051-2.

Nembrini C, Sichelstiel A, Kisielow J, Kurrer M, Kopf M, & Marsland BJ (2011). Bacterial-induced protection against allergic inflammation through a multicomponent immunoregulatory mechanism. *Thorax*. 66(9):755-63.

Nembrini C, Sichelstiel A, Kisielow J, Kurrer M, Kopf M, Marsland B J (2011). Bacterial-induced protection against allergic inflammation through a multicomponent immunoregulatory mechanism. *Thorax*. 66(9):755-63.

Nes IF, Bao Diep D, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H (1996) Biosynthesis of bacteriocins of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 70(2-4):113-28.

Nissen-Meyer J, Oppegard C, Rogne P, Haugen HS, Kristiansen PE (2010) Structure and mode of action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2(1):52-60.

O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, Shanahan F, Quigley EM (2005) *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*. 128(3):541-51.

O'Neill LA, Bowie AG (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7: 353–364.

Ogino T, Nishimura J, Barman S, Kayama H, Uematsu S, Okuzaki D, Osawa H, Haraguchi N, Uemura M, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Yamamoto H, Takeda K, Doki Y, Mori M (2013) Increased Th17-Inducing Activity of CD14(+) CD163(low) Myeloid Cells in Intestinal Lamina Propria of Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology* 145: 1380–1391.

Oppegard C, Rogne P, Emanuelsen L, Kristiansen PE, Fimland G, Nissen- Meyer J (2007) The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 13(4):210-9.

Orlando A, Refolo MG, Messa C, Amati L, Lavermicocca P, Guerra V, Russo F (2012) Antiproliferative and proapoptotic effects of viable or heat-killed *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HGC-27 gastric and DLD-1 colon cell lines. *Nutr Cancer*. 64: 1103–1111.

Otte JM, Cario E, Podolsky DK (2004) Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 126: 1054–1070.

Ouwehand AC, Isolauri E, He F, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S (2001). Differences in *Bifidobacterium* flora composition in allergic and healthy infants. *J Allergy Clin Immunol*. 108(1):144-5.

Oyama J1, Blais C Jr, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T (2004) Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 109: 784–789.

Parente E, Ricciardi A, Addario G (1994) Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 41:388–394.

Pattanayaiying R, H-Kittikun A, Cutter CN (2014) Effect of lauric arginate, nisin Z, and a combination against several food-related bacteria. *Int J Food Microbiol*. 188:135-46.

Perez RH, Zendo T, Sonomoto K (2014) Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb Cell Fact*. 13 Suppl 1:S3.

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach

J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J (2010) Human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 464(7285):59-65.

Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 118(2):229-41.

Rana C, Piplani H, Vaish V, Nehru B, Sanyal SN (2015) Downregulation of telomerase activity by diclofenac and curcumin is associated with cell cycle arrest and induction of apoptosis in colon cancer. *Tumour Biol*.

Reddy BS, Rivenson A (1993) Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Res*. 53: 3914–3918.

Reid G, Sanders ME, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A, Rastall RA, Roberfroid MB, Rowland I, Cherbut C and Klaenhammer TR (2003) New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol*. 37(2):105-18.

Riley MA, Chavan MA (2007) In *Bacteriocins: ecology and evolution*.

Riley MA, Wertz JE (2002) *Bacteriocins: evolution, ecology and application*. *Annu Rev Microbiol*. 56:117-37.

Rodes L, Khan A, Paul A, Coussa-Charley M, Marinescu D, Tomaro-Duchesneau C, Shao W, Kahouli I, Prakash S (2013) Effect of Probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on Gut-Derived Lipopolysaccharides and Inflammatory Cytokines: An In Vitro Study Using a Human Colonic Microbiota Model. *J Microbiol Biotechnol*. 23(4):518-26.

Roselli M, Finamore A, Britti MS, Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Mengheri E (2007) The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxi- genic *Escherichia coli*

K88 infection and prevents membrane barrier damage. *J Nutr* 137: 2709–2716.

Roselli M1, Finamore A, Nuccitelli S, Carnevali P, Brigidi P, Vitali B, Nobili F, Rami R, Garaguso I, Mengheri E (2009) Prevention of TNBS-induced colitis by different *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains is associated with an expansion of cdT and regulatory T cells of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bow Dis* 15: 1526–1536.

Round JL, Mazmanian SK (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 313–323.

Säemann MD, Böhmig GA, Zlabinger GJ (2002) Short-chain fatty acids: bacterial mediators of a balanced host-microbial relationship in the human gut. *Wien Klin Wochenschr*. 114(8-9):289-300.

Sayem SM, Manzo E, Ciavatta L, Tramice A, Cordone A, Zanfardino A, De Felice M, Varcamonti M (2011) Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb Cell Fact*. 10:74.

Schippa S and Conte MP (2014). Dysbiotic Events in Gut Microbiota: Impact on Human Health. *Nutrients*. 6(12):5786-805.

Segawa S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kobayashi N, Shigyo T, Kohgo Y (2011) Probiotic-Derived Polyphosphate Enhances the Epithelial Barrier Function and Maintains Intestinal Homeostasis through Integrin–p38 MAPK Pathway. *PLoS ONE* 6(8): e23278.

Sheil B, McCarthy J, O'Mahony L, Bennett MW, Ryan P, Fitzgibbon JJ, Kiely B, Collins JK, Shanahan F (2004) Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. *Gut* 53: 694–700.

Shi L, Günther S, Hübschmann T, Wick LY, Harms H, Müller S (2007) Limits of propidium iodide

as a cell viability indicator for environmental bacteria. *Cytometry A*. 71(8):592-8.

Shimazu T1, Villena J, Tohno M, Fujie H, Hosoya S, Shimosato T, Aso H, Suda Y, Kawai Y, Saito T, Makino S, Ikegami S, Itoh H, Kitazawa H (2012) Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* elicits anti-inflammatory activity in porcine intestinal epithelial cells by modulating negative regulators of the Toll-like receptor signaling pathway. *Infect Immun* 80: 276–288.

Smarda J and Smais D (1998) Colicins-exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol. Folia Microbiol (Praha)*. 43(6):563-82.

Sokol H1, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottière HM, Doré J, Marteau P, Seksik P, Langella P (2008) *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(43):16731-6.

Stagg AJ1, Hart AL, Knight SC, Kamm MA (2003) The dendritic cell: Its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* 52: 1522- 1529.

Strom K, Sjogren J, Broberg A, Schnurer J (2002) *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl Environ Microbiol* 68:4322–4327.

ten Brink B, Minekus M, van der Vossen JM, Leer RJ, Huis in't Veld JH (1994) Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J Appl Bacteriol*. 77(2):140-8.

Toba T, Yoshioka E, Itoh T (1991) Potential of *Lactobacillus gasseri* isolated from infant faeces to produce bacteriocin. *Lett Appl Microbiol*. 12:228–231.

Turnbaugh PJ, Gordon JI (2009) The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J Physiol.* 587(Pt 17):4153-8.

Ueno N, Fujiya M, Segawa S, Nata T, Moriichi K, Tanable H, Mizukami Y, Kobayashi N, Ito K, Kohgo Y (2011) Heat-killed body of *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates intestinal injury in a murine model of colitis by enhancing the intestinal barrier function. *Inflamm Bowel Dis*; 17(11):2235-50.

Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV (2008) Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(52):20858-63.

van Belkum MJ, Martin-Visscher LA, Vederas JC (2011) Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends Microbiol.* 19(8):411-8.

van der Gast CJ, Walker AW, Stressmann FA, Rogers GB, Scott P, Daniels TW, Carroll MP, Parkhill J, Bruce KD (2011). Partitioning core and satellite taxa from within cystic fibrosis lung bacterial communities. *ISME J.* 5(5):780-91.

van der Meer JR, Rollema HS, Siezen RJ, Beerthuyzen MM, Kuipers OP, de Vos WM (1994) Influence of amino acid substitutions in the nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem.* 269(5):3555-62.

Vaughan EE, Hans GHJ Heilig, Ben-Amor K, de Vos WM (2005) Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiol Rev.* 29(3):477-90.

Vaughan EE, Schut F, Heilig HG, Zoetendal EG, de Vos WM and Akkermans AD (2000) A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 1(1):1-12.

Vavricka SR, Musch MW, Chang JE, Nakagawa Y, Phanvijhitsiri K, Waypa TS, Merlin D, Schneewind O, Chang EB (2004) hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF- κ B and stimulating

IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* 127: 1401–1409.

Veiga P1, Gallini CA, Beal C, Michaud M, Delaney ML, DuBois A, Khlebnikov A, van Hylckama Vlieg JE, Punit S, Glickman JN, Onderdonk A, Glimcher LH, Garrett WS (2010) *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 18132- 18137.

Verhulst SL, Vael C, Beunckens C, Nelen V, Goossens H, Desager K (2008). A longitudinal analysis on the association between antibiotic use, intestinal microflora, and wheezing during the first year of life. *J Asthma* 45, 828–832.

Villena J and Kitazawa H (2014) Modulation of intestinal TLR4-inflammatory signaling pathways by probiotic microorganisms: lessons learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937. *Front. Immunol.* 4:512.

Vivo M, Di Costanzo A, Fortugno P, Pollice A, Calabrò V, La Mantia G (2009) Downregulation of $\Delta Np63\alpha$ in keratinocytes by p14ARF-mediated SUMO-conjugation and degradation. *Cell Cycle*. 8(21):3545-51.

Vivo M, Ranieri M, Sansone F, Santoriello C, Calogero RA, Calabrò V, Pollice A, La Mantia G (2013) Mimicking p14ARF Phosphorylation Influences Its Ability to Restrain Cell Proliferation. *PLoS One*. 8(1):e53631.

Walker WA (2008) Mechanisms of action of probiotics. *Clin Infect Dis*. 46 Suppl 2:S87-91.

Weinberg WC, Denning MF (2002) p21Waf1 control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit Rev Oral Biol Med*. 13(6):453-64.

Williams SC, Hong Y, Danavall DCA, Howard-Jones MH, Gibson D, Frisher ME, Verity PG (1998) Distinguishing between living nonliving bacteria: evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic

samples. *Journal of Microbiological methods* 32 225-236.

Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL (2001) The germless theory of allergic disease: Revisiting the hygiene hypothesis. *Nat. Rev. Immunol.* 1(1):69-75.

Wrzosek L, Miquel S, Noordine ML, Bouet S, Joncquel Chevalier-Curt M, Robert V, Philippe C, Bridonneau C, Cherbuy C, Robbe-Masselot C, Langella P, Thomas M (2013) *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol.* 11, 61.

Wu HJ, Ivanov II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D (2010) Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity.* 32(6):815-27.

Xia YH, Chen Q, Zhang M, Jiang YQ, Hang XM, and Qin HL (2011) Effect of *Lactobacillus plantarum* LP-Onlly on gut flora and colitis in interleukin-10 knockout mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26: 405- 411.

Yang EJ, Chang HC (2010) Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Int J Food Microbiol* 139:56–63.

Zeuthen LH, Christensen HR, and Frokiaer H (2006) Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with Gram-negative bacteria. *Clin. Vaccine Immunol.* 13: 365-375.

Zeytun A, Chaudhary A, Pardington P, Cary R, Gupta G (2010) Induction of cytokines and chemokines by Toll-like receptor signaling: strategies for control of inflammation. *Crit Rev Immunol* 30: 53–67.

Zoetendal EG, Cheng B, Koike S and Mackie RI (2004) Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 5(2):31-47.

Zughaier SM, Zimmer SM, Datta A, Carlson RW, Stephens DS (2005) Differential induction of the toll-like receptor 4-MyD88-dependent and independent signaling pathways by endotoxins. *Infect Immun* 73: 2940–2950.

Zvanych R, Lukenda N, Kim JJ, Li X, Petrof EO, Khan WI, Magarvey NA (2014) Small molecule immunomodulins from cultures of the human microbiome member *Lactobacillus plantarum*. *J Antibiot (Tokyo)*. 67(1):85-8.